

ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITA' DI BOLOGNA

FACOLTA' DI SCIENZE MATEMATICHE FISICHE E
NATURALI

Corso di laurea magistrale in BIOLOGIA MARINA

**Effetto dell'erbicida Terbutilazina sulla
crescita di flagellate marine in coltura**

Tesi di laurea in
BOTANICA MARINA APPLICATA

Relatore:
Prof.ssa Rossella Pistocchi

Presentata da:
Matilde Mazzotti

Correlatore:
Dott.ssa Emanuela Fiori

(III sessione)

Anno Accademico 2009/2010

..Ho scoperto
Il segreto del mare
Meditando
In una goccia di rugiada..
(K. Gibran)

INDICE

INTRODUZIONE.....	1
1. Il fitoplancton.....	1
1.1. Le microalghe flagellate	2
1.2. Le microalghe del mar Adriatico.....	5
1.3. Alghe flagellate studiate.....	8
1.3.1. <i>Gonyaulax spinifera</i>	15
1.3.2. <i>Prorocentrum minimum</i>	17
2. Prodotti fitosanitari.....	21
2.1. Terbutilazina.....	23
2.1.1. Caratteristiche chimico fisiche.....	23
2.1.2. Concentrazioni in ambiente acquatico.....	24
3. Effetto degli erbicidi sulle microalghe.....	27
3.1. Alterazione dell'attività fotosintetica.....	27
3.2. Alterazione delle comunità fitoplanctoniche.....	29
3.3. Influenza dei fattori ambientali sulla tossicità.....	30
 OBIETTIVI.....	 31
 MATERIALI E METODI.....	 33
4. Colture algali.....	33
4.1. Mantenimento dei ceppi algali.....	33
4.2. Colture “batch”.....	33
4.3. Terreno di coltura.....	34
4.4. Inoculo.....	35
4.5. Preparazione della soluzione di Terbutilazina.....	36
5. Disegno sperimentale.....	37
5.1. Screening preliminare.....	37
5.2. Esperimenti.....	38
6. Metodi di analisi per la valutazione della crescita algale e dell'attività fotosintetica	42

6.1. Curve di crescita.....	42
6.2. Conteggio delle cellule.....	44
6.3. Analisi di torbidità.....	45
6.4. Misura dell'attività fotosintetica tramite fluorimetro	
PAM.....	46
6.5. Analisi della clorofilla a.....	48
6.6. Analisi dei nutrienti.....	50
6.6.1. Analisi dei fosfati.....	50
6.6.2. Analisi dei nitrati.....	50
6.7. Determinazione dei polisaccaridi extracellulari.....	51
RISULTATI.....	53
7. Analisi preliminare della sensibilità di diverse microalghe	
flagellate dell'Adriatico alla terbutilazina.....	53
7.1. Effetto della terbutilazina sull'attività fotosintetica	
di 9 specie di microalghe.....	53
7.2. Effetto di basse concentrazioni di terbutilazina (0,5 µg/l,	
1µg/l, 5µg/l, 10µg/l, 15µg/l) sull'efficienza fotosintetica	
di <i>F. japonica</i> , <i>L. polyedrum</i> e <i>G. spinifera</i>	59
7.3. Effetto del metanolo sull'attività foto sintetica.....	61
8. Risposta di <i>G. spinifera</i> e <i>P. minimum</i> alla presenza di terbutilazina	
con diverse temperature.....	63
8.1. Effetto della terbutilazina sui parametri fisiologici di	
<i>G. spinifera</i>	64
8.1.1. Crescita.....	64
8.1.2. Efficienza fotosintetica	68
8.1.3. Contenuto cellulare: clorofilla a.....	72
8.1.4. Variabili extracellulari	74
8.1.4.1. polisaccaridi.....	74
8.1.4.2. nitrati e fosfati.....	75
8.2. Effetto della terbutilazina sui parametri fisiologici di	
<i>P.minimum</i>	77
8.2.1. Crescita	77
8.2.2. Efficienza fotosintetica	81

8.2.3. Contenuto cellulare: clorofilla a	84
8.2.4. Variabili extracellulari.....	86
8.2.4.1. polisaccaridi.....	86
8.2.4.2. nitrati e fosfati.....	87

DISCUSSIONE.....	89
-------------------------	-----------

BIBLIOGRAFIA.....	93
--------------------------	-----------

INTRODUZIONE

1. Il fitoplancton

Il termine plancton, dal greco “ciò che è vagante”, indica l’insieme degli organismi che vivono in sospensione nel mezzo acquoso, dal quale vengono trasportati in modo passivo, poichè incapaci di vincere, con movimenti propri, i moti del mare.

Ciò non significa che alcuni di questi organismi non possano variare la propria posizione verticale, su piccola scala, nella colonna d’acqua. Esso è distinto, in base alla nutrizione in zooplancton, composto da organismi animali, fitoplancton, composto da organismi vegetali, e batteri (Ghirardelli, 1981).

Lo zooplancton è composto da organismi animali eterotrofi.

Il fitoplancton è caratterizzato da organismi con metabolismi autotrofi fotosintetici, protisti e vegetali, generalmente unicellulari o a catene di cellule. Questi organismi utilizzano l’energia solare per trasformare il biossido di carbonio in carboidrati con liberazione di ossigeno, attraverso il processo fotosintetico.

I carboidrati e l’ossigeno prodotti sono successivamente utilizzati dai vegetali stessi per l’accrescimento e la riproduzione.

Il fitoplancton comprende organismi di dimensioni molto varie, appartenenti al picoplancton (0,2-2 μm), nanoplancton (2-20 μm) e microplancton (20-200 μm).

La dimensione è uno dei fattori che influenza maggiormente l’ecofisiologia del fitoplancton.

Il fitoplancton è il primo anello delle catene trofiche perché a questo gruppo di organismi, oltre che a quello delle macroalghe, si deve la produzione delle sostanze organiche che alimentano i consumatori del primo livello e quelli dei livelli superiori, la cui esistenza sarebbe impossibile senza i vegetali. E’ dunque molto importante conoscere quali sono i fattori che nelle acque regolano la distribuzione e l’accrescimento dei vegetali e come essi agiscono (Ghirardelli, 1981). La crescita e la successione stagionale del fitoplancton sono influenzate da vari fattori, tra i quali principalmente: intensità luminosa, temperatura e disponibilità di nutrienti.

I principali organismi costituenti il fitoplancton sono: cianobatteri, proclorofite, cloroficee, criptoficee, crisoficee, dinoflagellati e diatomee.

1.1. Le microalghe flagellate

Microalghe che possiedono flagelli si trovano in tutto il sistema di classificazione delle alghe, e quindi qualsiasi trattato su di loro come un gruppo deve comprendere un numero di taxa di gradi più alti tra classi, ordini e famiglie, che spesso contengono uno o pochi generi ai livelli inferiori. Alcuni generi sono monospecifici, mentre altri come *Chrysochromulina* e *Pyramimonas* possono contenere 50 o più specie.

Le flagellate sono presenti in tutti i biotopi marini, dalle acque oligotrofiche degli oceani a quelle eutrofiche della costa, alle acque salmastre. L'importanza ecologica delle microalghe flagellate è riposta nel ruolo trofico che questi organismi giocano in diversi ecosistemi. Nutrendosi di batteri, costituiscono una componente vitale del microbial loop, ma sono anche fonte di cibo per ciliati e larve mesozoe. (Tomas C. R. 1997).

Un sistema ben definito di classificazione non è accettabile per tutte le alghe esistenti, in quanto la tassonomia è sotto costante e rapida revisione a tutti i livelli a seconda delle nuove scoperte genetiche e ultrastrutturali di tutti i giorni. La natura polifiletica del gruppo algale è qualcosa di inconsistente se paragonata ai raggruppamenti tassonomici tradizionali e le opinioni tassonomiche possono cambiare, come le informazioni accumulate. Nella Tabella 1.1. si riporta lo schema di classificazione delle flagellate tratto da Barsanti et al. (2007) basato su quello di Van Den Hoek et al. (1995), e paragonato con la classificazione di Margulis et al. (1990), Graham and Wilcox (2000), Lewin (2002) :

Tabella 1.1. Schema di classificazione comprendente solo le flagellate marine

Divisione	Classe	Pigmenti principali
Cryptophyta	Cryptophyceae	clorofilla a e c
Dinophyta	Dinophyceae	clorofilla a e c
Heterokontophyta	Raphidophyceae	clorofilla a e c
	Chrysophyceae	
	Dictyochophyceae	
Euglenophyta	Euglenophyceae	clorofilla a e b
Chlorophyta	Chlorophyceae	clorofilla a e b
	Prasinophyceae	

Classe Dinophyceae

Le dinoflagellate sono un gruppo molto diversificato di organismi cellulari. Sono la seconda componente più importante del fitoplancton marino con circa 120 generi e 1700 specie viventi (Sournia et al. 1991)

Le Dinophyceae sono caratterizzate dalla presenza di un solco longitudinale e di uno trasversale, in ciascuno dei quali si trova un flagello. I due flagelli nascono dal punto di intersezione dei solchi; quello del solco trasversale è appiattito come un nastro, è ondulato e porta sul margine più esterno delle sottilissime ciglia vibratili. Il flagello più lungo oltrepassa la cellula e con i suoi movimenti ne consente l'ondeggiante avanzamento. Nelle specie più primitive è presente una pellicola molto flessibile e delicata (generi *Gymnodinium*, *Hemidinium*, *Gyrodinium*); mentre nelle Dinoflagellate superiori c'è una parete cellulare. Nella riproduzione, nelle specie tecate, le due metà della teca si allontanano separandosi lungo il solco trasversale. Successivamente le cellule figlie riformano la metà mancante o l'intera corazza.

Molte specie producono cisti; quelle di *Ceratium* possono sopravvivere più di sei anni.

Nelle Dinoflagellate si trovano esemplificati tutti i tipi di alimentazione: alcune specie sono completamente autotrofe, altre catturano e fagocitano esclusivamente altri organismi, altre ancora sono mixotrofiche, possono cioè

sintetizzare sostanze e assumerne di già preformate fagocitandole con pseudopodi. Certe specie traggono dall'ambiente anche sostanze organiche sciolte in soluzione, sono specie saprozoiche.

Molte flagellate sono dotate di tricocisti, filamenti mucilluginosi che vengono lanciati a scopo di difesa contro uno stimolo esterno. (Heinz Streble e Dieter Krauter 1992)

Le dinoflagellate hanno diverse differenze ecofisiologiche significative con le diatomee, differenze che includono una bassa affinità per i nutrienti, una considerevole diversità nella nutrizione che si evolve in mixotrofia, e diversità nella mobilità (Smayda, 1997).

Queste caratteristiche ecofisiologiche sono importanti nella dinamica e regolazione dei bloom e possono direttamente influenzare i tassi di crescita e le abilità competitive (Heil et al 2005).

Classe Raphidophyceae

Appartengono alla divisione Heterokontophyta e sono alghe unicellulari, di dimensioni relativamente grosse. La cellula ha simmetria dorsoventrale e porta due flagelli disuguali che emergono da un'invaginazione, uno rivolto anteriormente e dotato di peli, uno rivolto posteriormente e liscio. La cellula manca di una parete cellulare.

I cloroplasti sono numerosi e contengono le clorofille a , c1 e c2 , mentre i pigmenti secondari sono caratterizzati dall'abbondanza di fucoxantina, che dona alle cellule un colore giallo-bruno. Sono comuni nell'ambiente marino e originano maree colorate di colore bruno-giallastro verificatesi inizialmente soprattutto in Giappone e Nord America. Alcune specie producono tossine di tipo emolitico molto pericolose per i pesci. (Boni et al. 2005).

Fioriture di queste alghe sono state osservate negli ultimi due decenni nel Mare del Nord (lungo la costa Ovest della Danimarca e lungo quella sud della Svezia), nel mar Adriatico e lungo le coste Atlantiche di Scozia, Francia, Spagna e Portogallo. E' stato ipotizzato che molte specie di Raphidophyceae siano state recentemente introdotte nei mari Europei, attraverso l'importazione di molluschi o attraverso le acque di sentina delle navi (LIFEHAB 2001). Dato che queste alghe non possiedono una parete

cellulare sono assai fragili, le cellule si rompono a contatto con i fissativi normalmente usati per conservare i campioni di fitoplancton e pertanto risultano poco comuni nei campionamenti di plancton; proprio a causa di questa sporadica presenza nella comunità planctonica la classificazione di queste specie algali è ancora molto dibattuta.

I generi più comuni appartenenti a questa divisione sono : *Chattonella*, *Fibrocapsa* e *Heterosigma*.

1.2. Le microalghe del mar Adriatico

Le complesse dinamiche del fitoplancton in un sistema costiero diventano ancora più complesse in aree dove gli estuari scaricano enormi quantità di acqua dolce in piccoli bacini come l'Adriatico (Franco e Michelato, 1992).

Il nord Adriatico è una delle regioni più produttive del mar Mediterraneo nei diversi livelli trofici, dal fitoplancton ai pesci. In particolar modo la totale biomassa di plancton mostra un forte gradiente decrescente dalla foce del fiume Po verso est, così come dal nord al sud dell'Adriatico. L'opinione generale è che il fitoplancton trovi sufficienti nutrienti per crescere nel sistema costiero del Nord Adriatico per la maggior parte dell'anno (F. B. Aubry et al. 2004).

Il microfitoplancton è costituito soprattutto da diatomee che variano su scala temporale e spaziale con input fluviali intermittenti; generalmente mostrano due picchi massimi inverno-primaverili ed autunnali all'interno della colonna d'acqua, in modo evidente nelle acque costiere. Il nanoplancton è numericamente dominante in tutto il mar Adriatico, e più abbondante lungo le coste nelle zone più a Nord. Le Dinoflagellate sono caratteristiche del periodo estivo: la loro abbondanza non raggiunge mai valori elevati, con eccezione dei fenomeni di "marea rossa" che sono stati riportati, quasi ogni anno, durante gli anni 1970 lungo le coste dell'Emilia Romagna, Italia. Negli anni '70 l'apporto di nutrienti da parte del fiume Po era notevolmente aumentato, evidenziando massime concentrazioni nei primi anni del 1980. Alla fine degli anni 80' si è osservato invece un passaggio dalle "maree rosse" ai fenomeni di mucillagine, che hanno interessato l'intero bacino a

Nord nel 1988, 1989, 1991, 1997, 2000 e 2002 (S. Fonda Umani et al. 2005). L'ultimo episodio si è verificato nel 2004.

Il Nord Adriatico è un bacino poco profondo e stagionalmente stratificato (massima profondità intorno ai 70 m), che riceve ingenti quantità di acqua dolce da 22 (maggiori e minori) fiumi italiani. Questi fiumi portano la maggior parte dei nutrienti e del materiale organico (alloctono) al mare: un'elevata produttività primaria caratterizza l'area (Bartoluzzi et al. 1984)

La biomassa e la produzione fitoplanctonica sono molto variabili sia a livello spaziale che temporale, poiché le dinamiche del fitoplancton nei sistemi costieri diventano ancora più complessi nelle aree soggette a emissioni di grandi quantità di acqua dolce, come nel mar Adriatico Nord Occidentale. Inoltre guardando la tendenza generale del fitoplancton nel corso degli anni, i principali fattori limitanti per la crescita del fitoplancton nei sistemi costieri dell'Adriatico sono non solo la luce, ma anche la temperatura, e la forte influenza di fattori meteorologici (Sangiorgi et al. 2005).

Diversi autori tra cui Vollenweider et al. (1992) e Bernardi Aubry et al. (2004), hanno studiato la distribuzione del fitoplancton nel Nord Adriatico; hanno dimostrato che la popolazione fitoplanctonica è composta da centinaia di specie, di cui la maggior parte sono dinoflagellate, anche se, come previsto nei sistemi ricchi di nutrienti, la struttura delle comunità è dominata per la maggior parte dell'anno da diatomee. Le fioriture avvengono frequentemente, soprattutto lungo le coste italiane a causa dei modelli di circolazione dell'acqua, che spingono le acque ricche di nutrienti vicino alla costa (Zavatarelli et al. 1998). Le fioriture degli anni '70-'80 erano prodotte da poche specie, come le diatomee *Skeletonema costatum*, *Thalassiosira decipiens*, *Chaetoceros* spp., *Pseudo-nitzschia delicatissima*, e le dinoflagellate *Glenodinium lenticula*, *Prorocentrum* spp., *Lingulodinium polyedrum*, *Scrippsiella trochoidea*, *Gymnodinium* spp., *Gonyaulax fragilis* e *Alexandrium tamarense* (Boni et al. 1986; Vollenweider et al. 1992)

Le dinoflagellate sono le più abbondanti in giugno-luglio, dopo che le fioriture di diatomee hanno lasciato l'acqua relativamente povera di nutrienti (fig. 1.1.). Le dinoflagellate necessitano di minori concentrazioni

di nutrienti rispetto alle diatomee ed hanno caratteristiche più termofile (Bernardi Aubry et al. 2004).

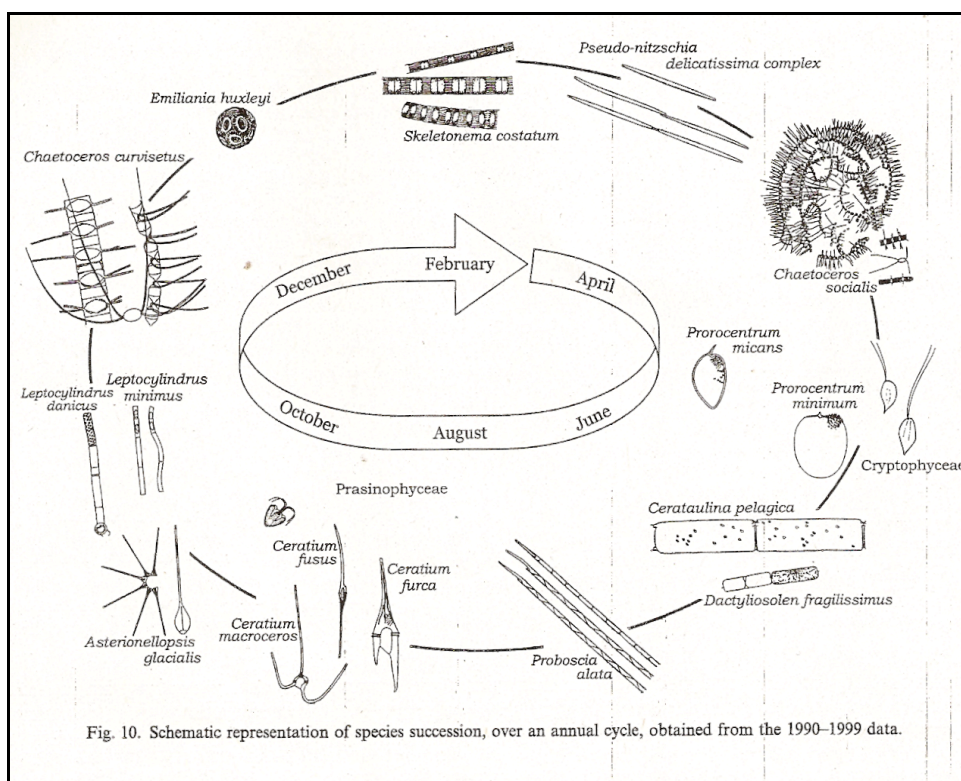


Figura 1.1. Successione annuale di specie microalgali nel Nord Adriatico

Nel Nord Adriatico, le concentrazioni del carbonio organico particolato (POC) e di materia organica particolata (POM) dipendono principalmente da immissioni dal fiume Po, dai maggiori fiumi Italiani e dalla biomassa fitoplanctonica (Gilmartine et Revelante 1991).

La successione di specie, nel corso dell'anno, sottolinea il basso numero di dinoflagellate nella comunità (2% dell'abbondanza); solo in giugno-luglio le dinoflagellate sono presenti con abbondanze significative, come osservato per *P. minimum*, *Gymnodinium* sp e *Ceratium fusus*. Nel Nord ovest dell'Adriatico, nella zona compresa fra il fiume Tagliamento e il fiume Po, non ci sono state frequenti "maree rosse", come si evince dallo studio effettuato da Aubry et al. (2004) in un periodo compreso fra 1990 e il 1999; questo perché si ritiene che lo sviluppo delle dinoflagellate sia ostacolato dai sistemi ad alta variabilità idrodinamica. Al contrario, in altri sistemi costieri dell'Adriatico (a sud del fiume Po), esposti a un minor idrodinamismo, sono stati spesso descritti casi di maree rosse.

Nell'Adriatico Nord occidentale, contaminazioni di molluschi con DSP (diarrhetic shellfish poisoning) e PSP (paralytic shellfish poisoning) sono state registrate sin dal 1989, e spesso sono associate alla presenza di specie di dinoflagellate tossiche. Ci sono state fioriture sporadiche lungo le coste del Nord Adriatico. Specie potenzialmente tossiche nel nord Adriatico sono *Dinophysis* spp., *Alexandrium minutum*, *Lingulodinium polyedrum*, *Protoceratium reticulatum* e *Pseudo-nitzschia* spp. *L. polyedrum* è stato trovato essere associato con la produzione di esotossina (YTX) nel Nordovest Adriatico (Satake et al.1997; Tubaro et al. 1997). Questa dinoflagellata ha dato luogo a fioriture sporadiche dal 1975 nel mar Adriatico. *P.reticulatum* è anch'esso associato alla produzione di yessotossina che ha contaminato i molluschi lungo le coste dell'Emilia Romagna. (Boni et al. 2000)

1.3. Alghe flagellate studiate

Per quanto riguarda il progetto svolto per la realizzazione della tesi sono state prese in considerazione 9 specie di microalghe appartenenti a diverse classi flagellate, comunemente ritrovate nel mar Adriatico. Di seguito viene fornita una breve descrizione delle flagellate utilizzate per uno screening iniziale, mentre le due specie utilizzate negli esperimenti veri e propri sono descritte in maniera più approfondita nei paragrafi successivi.

Phylum: Dinophyta

Classe Desmophyceae

Ordine: Prorocentrales

Famiglia : Prorocentraceae

Specie ***Prorocentrum micans*** (Ehrenberg) è una dinoflagellata marina, planctonica, cosmopolita in acque tropicali e temperate, neritiche ed estuarine. E' la specie più comune e diversificata del genere *Prorocentrum*. Forma imponenti fioriture algali; Le cellule appartenenti a questa specie hanno forma e dimensioni molto variabili (35-70 µm di lunghezza e

20-50 μm di larghezza), sono fortemente appiattite e presentano una spina apicale ben sviluppata sulla valva sinistra. La superficie della cellula è rugosa con poco profonde e minute dimensioni (fig.1.2.).

Classe Dinophyceae

Ordine Gonyaulacales

Famiglia Gonyaulacaeae

Genere Gonyaulax

Genere Lingulodinium

Specie ***Lingulodinium polyedrum*** (Stein): dinoflagellata tecata appartenente alla famiglia delle Gonyaulacaeae. Le cellule sono di forma poliedrica ed hanno dimensioni che variano fra 40-54 μm di lunghezza e 37-53 μm di larghezza. Le piastre che costituiscono la teca hanno un reticolo delicato e con numerosi pori; il cingolo è profondo (fig. 1.3 e 1.4); è bioluminescente; il ciclo vitale è caratterizzato da riproduzione asessuata, formazione di cisti temporanee e riproduzione sessuata. Le cisti sono sferiche con una doppia parete cellulare ed una superficie granulare coperta di spine; per la germinazione delle cisti sono necessari alti livelli di nutrienti. *L. polyedrum* è cosmopolita e si trova soprattutto in zone costiere temperate e subtropicali (Paz et al. 2008).

Genere Protoceratium

Specie ***Protoceratium reticulatum*** (Claparède and Lachmann) Bütschli1885 (= *Gonyaulax grindleyi* Reinecke 1967): secondo studi recenti *P.reticulatum* potrebbe essere un gruppo comprendente più specie ma sono ancora necessari studi tassonomici più approfonditi. E' una dinoflagella tecata, planctonica appartenete alla famiglia delle Gonyaulacaeae. Le sue dimensioni oscillano tra i 28-43 μm di lunghezza

e i 25-35 μm di larghezza; ha una forma poliedrica una forte teca costituita da diverse placche. La teca presenta un reticolo ben evidente con pori al centro di ogni reticolo; è bioluminescente e forma cisti sferiche con spine (figura 1.5.). Tenendo presente che è stato trovato in diversi luoghi, si pensa che *P.reticulatum* sia in grado di crescere all'interno di una vasta gamma di condizioni di temperatura, salinità, luce, pH e concentrazioni di nutrienti (Paz et al. 2008).. Inoltre la dinoflagellata *P.reticulatum* è stato il primo organismo identificato come produttore di YTX (Satake et al.1997).

Genere *Alexandrium*

Specie *Alexandrium lusitanicum* (E. Balech): dinoflagellata con corpo tondeggiante o angolare, cingolo mediano ma spostato su una larghezza sul lato destro ventrale; ha una teca con placche di cellulosa (figura 1.6); nucleo mediano a forma di U; è fotosintetica e possiede sempre cloroplasti; al genere *Alexandrium* appartengono più specie neurotossiche che a qualsiasi altro genere di alga tossica (produce saxitossine, una famiglia di tossine responsabili di sindrome PSP “paralytic shellfish poisoning”). Alcune specie di *Alexandrium* possono dare origine a fioriture imponenti ma di breve durata. E'importante la capacità di formare cisti, la cui germinazione è controllata dalla temperatura. In Italia la contaminazione di molluschi da parte di questa specie si è verificata per la prima volta nel 1994, e le fioriture non raggiungono mai numeri di cellule per litro molto elevati e non hanno elevate velocità di crescita. Questa microalga si trova solitamente nelle zone più superficiali della colonna d'acqua e soprattutto in primavera.

Ordine Peridinales

Famiglia Peridiniaceae

Genere Scrippsiella

Specie *Scrippsiella trochoidea* (Stein) Possiede cellule tectate di dimensioni variabili, comprese tra 23-37 μm di lunghezza e i 19-30 μm di larghezza (figura 1.7). Produce cisti calcaree di resistenza (Lewis, 1991.)E' una specie cosmopolita neritica ed estuarina. E' la dinoflagellata scrippsielloide più comunemente registrata.



Figura 1. 2. Prorocentrum micans

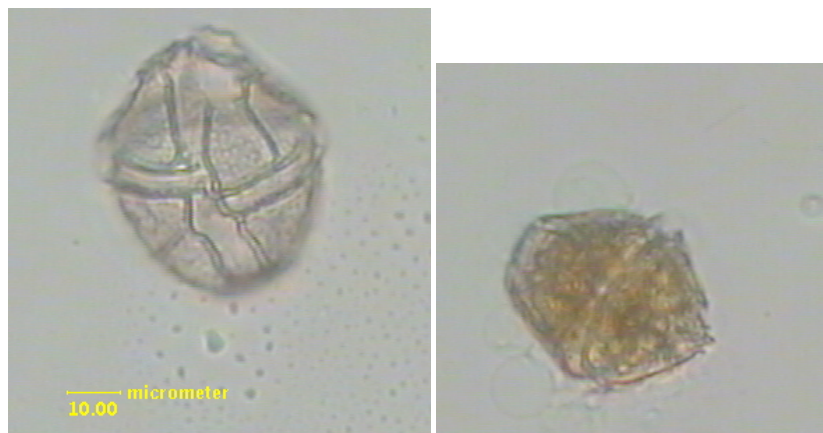


Figura 1.3 e 1. 4. Lingulodinium polyedrum



Figura 1.5 Protoceratium reticulatum



Figura 1. 6 Alexandrium lusitanicum



Figura 1.7 Scrippsiella trochoidea

Phylum Heterokontophyta

Classe Raphidophyceae

Ordine Chattonellales

Famiglia Chattonellaceae

Genere Fibrocapsa

Specie ***Fibrocapsa japonica*** (S.Toriumi & H.Takano): le cellule hanno forma ovoidale, leggermente appiattita. Dall'estremità anteriore sporgono due flagelli, di cui, uno si protende in direzione posteriore, e l'altro in direzione anteriore rispetto all'asse longitudinale del corpo. La lunghezza di queste cellule è di 20-37 μm e la larghezza è di 15-24 μm . Le cellule non sono dotate di parete cellulare e quindi sono estremamente fragili nei confronti dei cambiamenti ambientali (figura 1.8.). *F. japonica* ha una distribuzione globale, e si trova lungo le coste temperate, calde e fredde. (De Boer et al. 2004)

Genere Heterosigma

Specie ***Heterosigma hakashiwo*** (Y. Hada) : la cellula ha forma ovoidale, con l'estremità anteriore arrotondata e quella posteriore leggermente appuntita. Circa a metà della superficie laterale, in una posizione leggermente spostata in direzione anteriore, sporgono due flagelli. Il colore può variare dal giallo al giallo bruno. Ha una lunghezza compresa fra gli 8 e i 25 μm e la larghezza varia tra i 6 e i 15 μm (figura 1.9.). E' una specie largamente diffusa lungo le coste nipponiche e causa frequenti maree rosse, spesso associate ad una massiccia mortalità di specie ittiche. E' presente anche nei mari italiani e in Adriatico provoca fioriture estive.

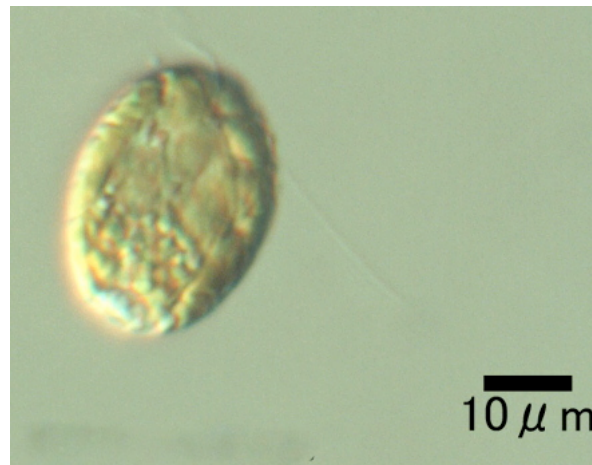


Figure 1.8. Fibrocapsa japonica



Figure 1.9. Heterosigma hakashiwo

1.3.1. *Gonyaulax spinifera* (Claparède & Lachmann)

Dinoflagellata tecata con forma poliedrica appartenente alla famiglia delle Gonyaulacaceae. Le Gonyaulaceae comprendono cellule con diverse forme, da ovoidali a squadrate a fusiformi. In molte specie le placche tecali sono spesse e pesantemente ornate con ponti longitudinali o aree inspessite attorno ai numerosi pori. In *G. spinifera* sono state osservate numerose e differenti tipologie ornamentali. Una caratteristica generale è la presenza di un piccolo poro ventrale che si può trovare sia ad un lato della prima placca che in cima alla seconda placca.

Non ci sono molti studi per quanto riguarda il contenuto cellulare della famiglia delle Gonyaulacaceae, ma sembra che tutte le specie siano fotosintetiche, e a giudicare dal loro colore da vive, probabilmente contengono peridininina come principale pigmento carotenoidale. I pigmenti sono stati studiati in modo dettagliato solo su due specie. Osservazioni sul materiale vivente hanno mostrato come condizioni avverse inducano facilmente a far fuoriuscire il contenuto cellulare attraverso il foro lasciato dalla rimozione della terza placca. Probabilmente il risultato è la formazione di una ciste temporanea e questo inoltre spiegherebbe perché nei campioni di plancton ci siano spesso le teche vuote (Dodge 1989).

Le dimensioni di *G. spinifera* variano tra i 24-50 μm di lunghezza e 30-40 μm di larghezza; le cellule sono ovoidali, l'epiteca ha lati convessi e un piccolo corno e presenta da 2 a 4 spine apicali; il solco si estende per quasi tutta la lunghezza della cellula; il cingolo è profondo e dislocato di due o più larghezze. Ci sono diverse tipologie di cisti associate alla cellula mobile di questa specie (Paz et al. 2008).

Il complesso di specie di *G. spinifera* include 3 specie con caratteristiche morfologiche simili che possono essere confuse facilmente: *G. spinifera*, *G. digitale*, *G. diegenesis*. Questo gruppo di dinoflagellate può dar luogo a 16 specie di cisti con diverse morfologie.

Le cellule mobili sono ovoidali con un corno apicale distinto. Le placche tecali sono debolmente ornate e i loro confini sono spesso segnati da creste discontinue, rendendo difficile individuare le singole placche. Quest'ultime sono ornate con un motivo a reticolo debolmente sviluppato che si trova

distribuito in modo irregolare sulla superficie delle placche. (Rochon et al. 2009).

E' una specie che provoca fioriture frequenti ed è stata recentemente identificata come produttrice di YTX (yessotossina); in particolare può contenere sia YTX che homoYTX come tossina prevalente (Riccardi et al. 2009).

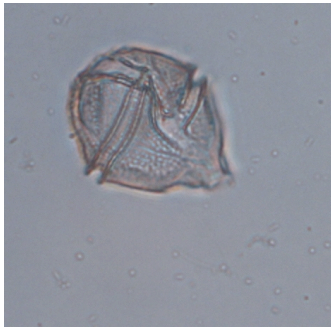


Figura 1.10. G. spinifera

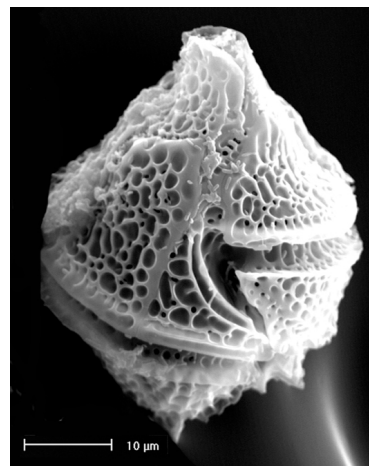


Figura 1.11. G. spinifera al SEM

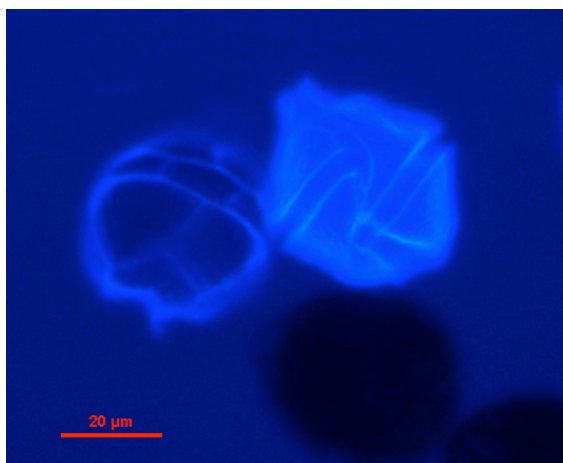


Figura 1.12. G. spinifera in fluorescenza

1.3.2. *Prorocentrum minimum* (Pavillard)

E' una dinflagellata neritica appartenente all'ordine Prorocentrales. Che origina bloom con una distribuzione globale. Fin dalla prima descrizione fatta da Pavillard nel 1916 c'è stata una considerevole confusione riguardo l'identificazione di *P. minimum* dovuta soprattutto all'estrema variabilità della forma della cellula (Hulburt, 1965) e alla presenza di una piccola spina anteriore non sempre riconoscibile con il microscopio ottico. Per questo motivo troviamo moltissimi sinonimi per *P. minimum* in letteratura.

P. minimum è di dimensioni ridotte, con una lunghezza fra i 14 e i 22 µm e una larghezza fra i 10 e i 15 µm, con forma variabile, dall'ovale al triangolare, appiattita da un lato e con una leggera concavità nella parte terminale più ampia (Faust, 1947). La superficie della cellula è rivestita da piccole spine, ed un'unica piccola spina si trova nella parte terminale anteriore. *P. minimum* è una dinoflagellata molto diffusa, caratterizzata dalla formazione di fioriture in molte acque costiere ed in estuari di tutto il mondo. Le fioriture di questa specie sono diventate più frequenti e sembra che abbiano subito un'espansione geografica nel passato, per diversi decenni, probabilmente in relazione all'attività umana e all'eutrofizzazione all'interno di sistemi localizzati.

Per quanto riguarda la tossicità, focolai di impatti sull'uomo di *P. minimum* sono stati registrati in tutto il mondo (caso di mortalità più significativo in Giappone, marzo 1942, con 114 morti su 324 persone affette da *P. minimum* dopo il consumo di ostriche). I sintomi sembrano assomigliare ai sintomi relativi alla sindrome DSP (diarrhetic shellfish poisoning). *P. minimum* è quindi considerato potenzialmente tossico per l'uomo attraverso l'ingestione di molluschi tossici, anche se l'associazione riportata tra le fioriture di *P. minimum* e la tossicità per l'uomo è rara (Taylor et al 2003). Molti ricercatori considerano questa specie benigna e innocua per la salute umana; comunque nelle aree in cui sono stati isolati cloni con componenti tossiche dimostrate o in aree dove la tossicità associata a fioriture di *P. minimum* non è stata completamente spiegata o attribuita ad altre cause, *P. minimum* deve essere considerato potenzialmente tossico. Inoltre effetti potenzialmente dannosi relativi all'elevata biomassa algale si verificano in tutte le aree in cui si hanno fioriture di dinoflagellate.

Anche se generalmente *P. minimum* non è considerata tossica per gli invertebrati marini, è stato visto che grandi fioriture hanno causato danni a causa dell'elevata biomassa algale con i relativi effetti (esaurimento di ossigeno, cambiamenti di pH, significativa attenuazione della luce).

P. minimum è usata comunemente come cibo algale in studi sperimentali (per zooplancton, ciliati, molluschi, o per test di tossicità sulla fauna).

Questa specie ha una gamma di adattamenti fisiologici che la rendono più "reattiva" all'eutrofizzazione: è capace di una rapida crescita, e può utilizzare una vasta gamma di substrati / nutrienti organici ed inorganici, e può crescere sotto una grande varietà di condizioni di irradianza fotosintetica, salinità, e temperature.

P. minimum è stata descritta come una specie euriterma ed eurialina e le fioriture possono presentarsi in un ampio range di condizioni ambientali (Tango et al. 2005). In molti casi, le fioriture si trovano in acque relativamente calde, poco turbolente, durante periodi di elevata irradianza. Studi sperimentali hanno mostrato che *P. minimum* può crescere in un ampio range di salinità, tra 2 e 35 psu, ma ha una crescita ottimale fra 15 e 17 psu. In molti studi inoltre le fioriture di *P. minimum* sono state collegate a diminuzioni di salinità (Mendez 1993), di solito associate a input di acqua dolce che per coincidenza provoca un aumento di nutrienti (Grzebyk e Berland 1996).

Fioriture di *P. minimum* seguono a fioriture di diatomee, dalla tarda primavera per tutta l'estate. In particolare è stata descritta in diverse occasioni un'associazione con le fioriture della diatomea *Skeletonema costatum* (interazione forse dovuta al fatto che entrambe le alghe prediligono la stesse salinità e temperature).

Dalla letteratura è stata messo in evidenza come *P. minimum* sia una specie in rapida espansione geografica (negli ultimi 30-40 anni). Possibili cause di espansione e incremento dei bloom sono da includere nel trasporto nelle acque di zavorra delle navi, aumento dell'acquacoltura ed eutrofizzazione.

Una caratteristica unica di *P. minimum* è l'ampio range di tassi di crescita riportato per questa specie: da 0,12 a 3,54 μ day⁻¹. Sebbene alcuni studi su colture hanno suggerito come *P. minimum* sia fotosinteticamente flessibile e adattabile a diverse intensità luminose, l'associazione di alti tassi di crescita

con elevate intensità luminose suggeriscono come la fioritura di questa alga potrebbe essere favorita da periodi relativamente estesi a maggiori intensità luminose. Anche la temperatura è un altro fattore fondamentale nel determinare la velocità di crescita.

P. minimum è in grado di mantenere i suoi pigmenti e le sue capacità fotosintetiche a intensità luminose estremamente basse e con acque superficiali con pochi nutrienti in estate, grazie alla capacità di migrazione lungo la colonna d'acqua fino al picnoclino per ottenere i nutrienti che gli servono. Inoltre l'abilità di *P. minimum* di mantenere un uptake sufficiente di nitrogeno e carbonio sotto condizioni di scarsa intensità luminosa è legato alla capacità di fotoadattamento e a tendenze mixotrofiche

P. minimum è capace di alimentarsi sia in modo autotrofico sia in modo mixotrofico, e sebbene sia molto conosciuta la nutrizione autotrofica di questa specie, rimane da studiare ancora molto riguardo la nutrizione mixotrofica, incluse le condizioni ambientali che favoriscono quest'alimentazione e il ruolo che questo modo nutrizionale gioca nelle dinamiche delle fioriture (Heil et al. 2005).

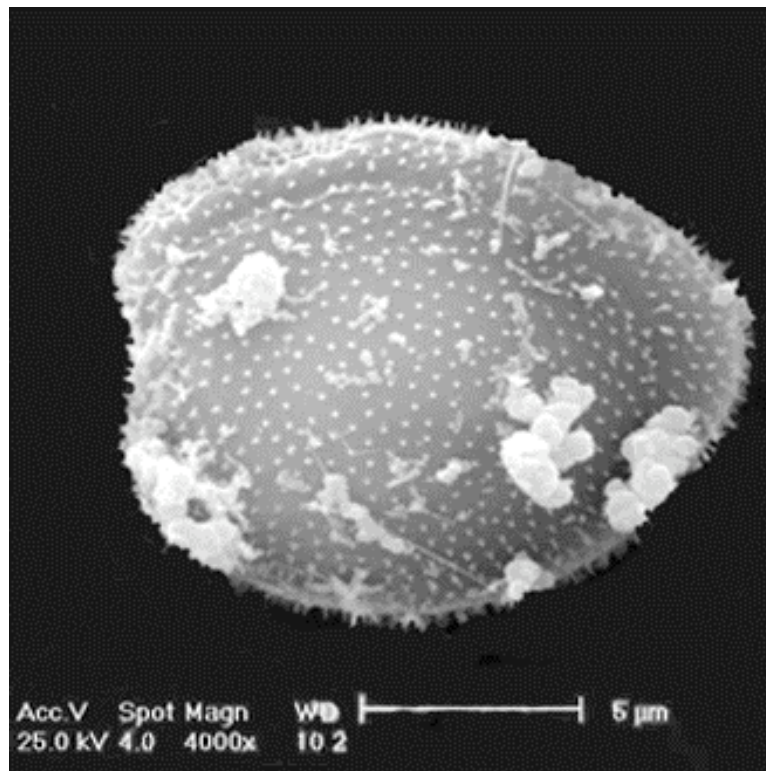


Figura 1.13. P. minimum al SEM



Figura 1.14. P. minimum

2. Prodotti fitosanitari

I prodotti fitosanitari sono largamente usati in agricoltura e rappresentano una sorgente di inquinamento diffusa di particolare rilievo. I prodotti fitosanitari usati comunemente in agricoltura vengono applicati solamente durante periodi specifici dell'anno, soprattutto in primavera dopo forti piogge, nei brevi periodi di inondazioni dei fiumi e dei canali.

Tali sostanze, per le loro caratteristiche di tossicità e di persistenza, possono rappresentare un potenziale pericolo per l'uomo e per gli ecosistemi; inoltre particolarmente vulnerabile ed a rischio d'inquinamento risulta la risorsa idrica.

Gli erbicidi hanno impatti diretti e indiretti sull'ecosistema acquatico, che spaziano da effetti istantanei a effetti a lungo termine come bioaccumulo e bioamplificazione attraverso la catena alimentare. (Carafa et al. 2007)

In particolare ogni anno in Italia vengono impiegate circa 150.000 tonnellate di prodotti fitosanitari e la maggior parte delle sostanze utilizzate a beneficio delle produzioni agricole, è costituita da molecole di sintesi concepite per combattere determinati organismi nocivi, per questo generalmente pericolose per tutti gli organismi viventi. In particolare nel 2004 sono state immesse sul mercato 154.386 tonnellate di formulati commerciali con un contenuto di sostanze attive pari a 84.291 tonnellate . (APAT 2005)

Dal piano di tutela delle acque redatto dall'ARPA nel settembre 2003 emerge che i prodotti maggiormente riscontrati sono Atrazina, Alaclor, Clorpirifos, Cloridazon, Desetil-atrazina (metabolita dell'atrazina), Desetil-terbutilazina (metabolita della terbutilazina), Etofumesate, Lenacil, Metolaclor, Molinate, Oxadiazon, Propanil, Propizamide, Simazina, Terbutilazina e Tiobencarb.

Solo per alcuni di essi (Alaclor, Atrazina, Clorpirifos, Cloridazon, Endosulfan e Simazina) sono stati stabiliti i limiti di riferimento del Decreto ministeriale, in fase di approvazione, in termini di standard di qualità delle acque (Tab. 2.1.)

Tabella 2.1. Limiti di riferimento del Decreto ministeriale in fase di approvazione

Sostanze	2008 (µg/l)	2015 (µg/l)
Alaclor	0,1	0,03
Atrazina	0,05	0,01
Clorpirifos	0,001	0,0001
Cloridazon	1	1
Endosulfan	0,0001	0,00001
Simazina	0,2	0,02

Per tutti gli altri principi attivi è stato stimato come valore limite 0,05 µg/l, in quanto considerato valore intermedio e cautelativo. I risultati ottenuti mostrano, nelle stazioni ubicate in provincia di Piacenza, la presenza di composti appartenenti alla famiglia dei diserbanti, che essendo applicati ai suoli interessano maggiormente il comparto acque a causa dei fenomeni di percolamento e dilavamento. I prodotti riscontrati sono: Terbutilazina, Atrazina, Metolaclor, Alaclor, Oxadiazon e Molinate

L'impiego di questi diserbanti è, d'altra parte molto diffuso nelle comuni pratiche agricole (colture estensive, orticole e frutticole) condotte nei territori in cui ricadono queste stazioni, con la sola esclusione dell'Atrazina, che nonostante il divieto di impiego e vendita sancito dall'ordinanza ministeriale del 18/3/92 n. 705/910 dà ancora luogo a ritrovamenti, e del Molinate, principio attivo specifico per il diserbo del riso, proveniente, probabilmente, dalla zona piemontese tramite il fiume Po.

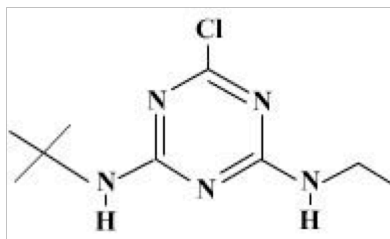
Particolarmente critica è la contaminazione dovuta alla terbutilazina, una sostanza in fase di revisione a livello comunitario ed il cui uso in qualche Paese è stato vietato: la contaminazione è diffusa in tutta l'area padano-veneta ed evidenziata anche in alcune regioni del centro-sud. E' stata trovata nel 51,5% dei punti di campionamento delle acque superficiali (di cui nel 29,2% dei casi oltre il limite) e nel 16,1% di quelli delle acque sotterranee (con il 2,7% dei casi sopra il limite massimo di concentrazione prevista). (APAT "Rapporto nazionale residui di prodotti fitosanitari nelle acque").

2.1. Terbutilazina

La terbutilazina è tra i prodotti fitosanitari più venduti ed utilizzati in Italia. Dati di monitoraggio nazionali ed internazionali dimostrano che questo prodotto e il suo metabolita N-dealcolato, la desetil-terbutilazina (DET), sono presenti nelle acque superficiali e sotterranee a concentrazioni spesso superiori alle CMA vigenti per le acque potabili.

Nel nostro paese la terbutilazina è attualmente presente in 52 prodotti autorizzati al commercio, di cui 4 in via provvisoria, come unico componente o in miscela con altri erbicidi (alaclor, metolaclor, s-metolaclor, glifosate, pendimetalin, terbumeton, ecc) (Min. Sal. 2007).

2.1.1. Caratteristiche chimico fisiche



IUPAC: N2-tert-butyl-6-chloro-N4-ethyl-1,3,5-triazine-2,4-diamine

CAS: 6-chloro-N-(1,1-dimethylethyl)-N'-ethyl-1,3,5-triazine-2,4-diamine

Formula: C₉H₁₆Cl Peso molecolare 229,7

Densità: 1188 Kg m⁻³ (20 °C)

Solubilità in acqua: 8,5 mg l⁻¹ (pH 7, 20 °C)

Punto di fusione: 177-179 °C

Pressione di vapore: 0,15 mPa (25 °C)

Costante di Henry: 4,05 · 10⁻³ Pa m³ mol⁻¹

KOW: Log P = 3,21

DT50: suolo 30-60 giorni

KOC: 162-278 ml g⁻¹

Classe chimica: Triazine

La terbutilazina è un anello 1,3,5 N-triazinico stabile con attività erbicida che consiste nella inibizione della fotosintesi per alterazione delle proteine di membrana dei cloroplasti. Come sarà riportato più avanti, dipende

dall'atomo di cloro in C2 e in parte anche alle catene N-alchiliche laterali che influiscono sull'attività biologica ma anche sulla velocità di degradazione.

Riguardo alle dinamiche chimico-fisiche della terbutilazina e della DET, dati di letteratura scientifica e dati tratti da studi di laboratorio e di campo condotti da RSA, ISS, spesso in collaborazione con altri Enti nazionali, indicano che la terbutilazina e la DET sono potenzialmente mobili nel suolo e dotate di persistenza da moderata ad elevata (Fig. 2.1.).

I due composti risultano spesso co-presenti e per la DET si riportano tipicamente frequenze di rilevamento e concentrazioni superiori rispetto alla terbutilazina. Queste due sostanze rappresentano quindi un rischio per la salute dell'uomo e degli ecosistemi acquatici.

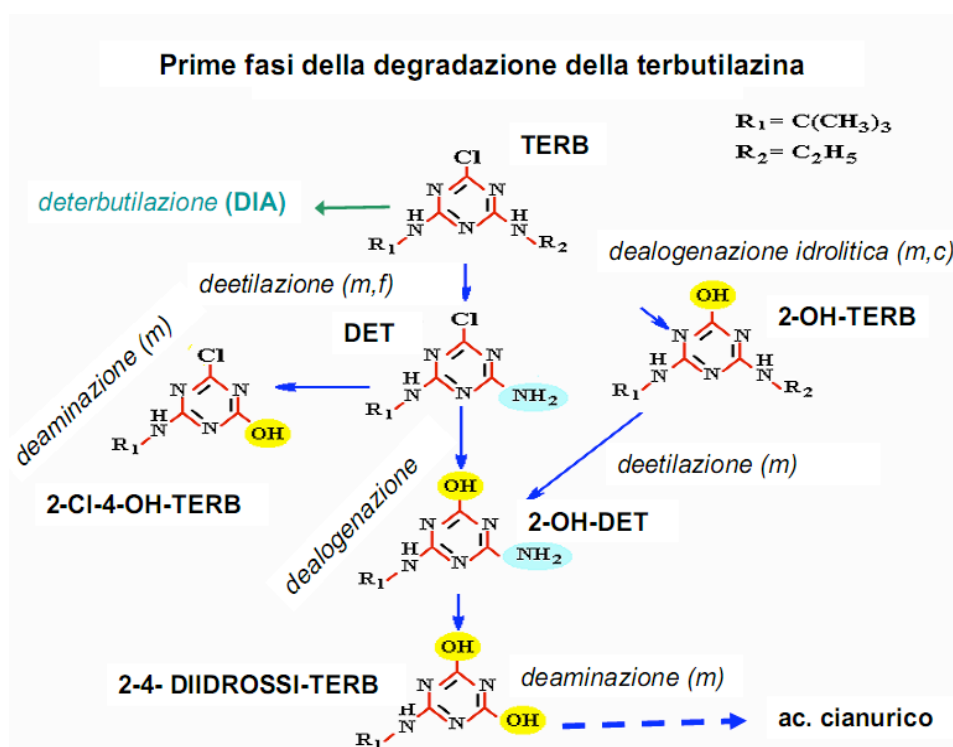


Figura 2.1. degradazione della terbutilazina nel suolo

2.1.2. Concentrazioni nell'ambiente acquatico

Gli erbicidi triazinici e alcuni prodotti della loro degradazione sono fra le sostanze più frequentemente rinvenute sia nelle acque superficiali, sia in quelle sotterranee, con concentrazioni spesso superiori al limite fissato per le acque potabili.

Gli erbicidi triazinici sono usati in grandi quantità in molti Paesi, ad esempio in USA circa 35×10^6 kg di atrazina, 9×10^6 kg di cyanazina e 3×10^6 kg di simazina vengono impiegati ogni anno.

In Italia come risulta dal monitoraggio ARPA 2005-2006-2007-2008 la terbutilazina è un prodotto molto impiegato per il diserbo del mais. Il suo utilizzo è stato limitato a partire dal 2003 alle sole colture di mais e sorgo ed all'impiego della dose massima di 1Kg di Terbutilazina per ettaro.

Dal 1 gennaio 2008 è vietato commercializzare ed impiegare prodotti a base di sola terbutilazina (sono ammesse solo miscele pronte all'impiego); ciò determina l'effettivo rispetto della dose massima per ettaro.

La terbutilazina presenta inoltre un marcato andamento stagionale, risultante dalla combinazione dell'uso e delle precipitazioni meteoriche che sostanze come l'atrazina non hanno (Figura 2.2.)

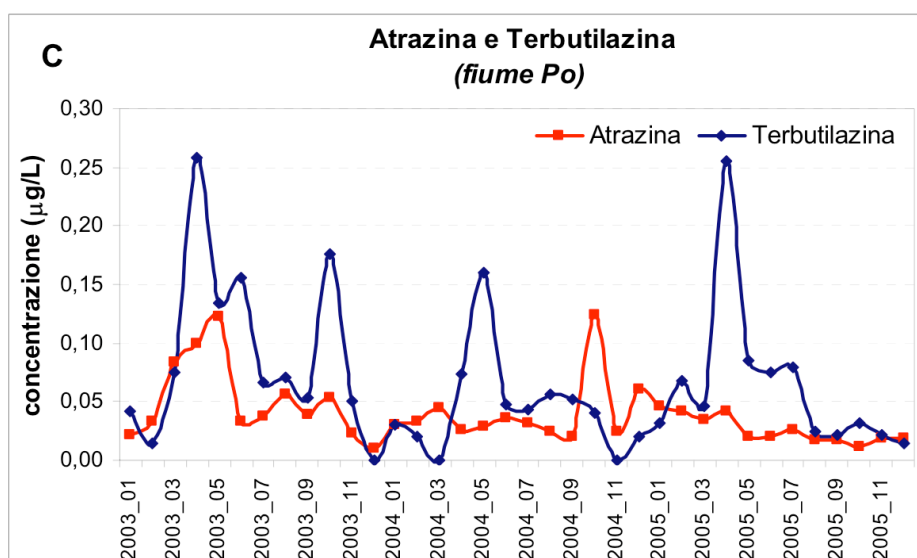


Figura 2.2. Concentrazioni di atrazina e terbutilazina dal 2003 a tutto il 2005 nel fiume Po

Dallo studio di Carafa et al.(2007) relativo all'individuazione di erbicidi e relativi metaboliti nell'acqua, nei sedimenti e in organismi (ulva e vongole) nella Sacca di Goro (laguna costiera, nel delta del fiume Po), si può notare come sia nei campioni dell'acqua che del sedimento, l'erbicida più presente sia la terbutilazina con rispettivi massimi di 694,32 ng/L e 9,36 µg/L. Inoltre sono evidenti picchi di 234, 50 ng/L di erbicida nei campioni d'acqua prelevati in superficie nel sito di campionamento più vicino al mare Adriatico, sotto la diretta influenza del mare (Fig .2.3.).

Table 1
Limit of detection (LOD), range, mean, standard deviation and median values of herbicides concentrations determined in the upper water column of the Sacca di Goro

ng/l	LOD	Sacca di Goro					Adriatic Sea				
		Average	St. dev	Max	Min	Median	Average	St. dev	Max	Min	Median
Atrazine	0.8	4.57	1.55	8.18	2.35	4.18	3.75	1.68	5.93	1.27	3.90
Atrazine-desethyl-2-hydroxy (OH-DEA)	1.1	3.35	3.88	14.97	bdl	1.31	3.11	3.73	8.89	bdl	2.12
Atrazine-desisopropyl (DIA)	2.3	bdl	2.20	11.21	bdl	bdl	bdl	1.21	3.43	bdl	bdl
Atrazine-2-hydroxy (OH-Atrazine)	1.1	65.51	71.36	193.17	bdl	32.11	39.42	42.74	113.02	bdl	25.48
Atrazine-desethyl (DEA)	0.2	0.60	1.19	4.10	bdl	bdl	0.27	0.67	1.63	bdl	bdl
Simazine	0.8	6.11	5.66	24.13	1.45	3.01	6.18	9.70	25.96	1.83	2.10
Simazine-2-hydroxy (OH-Simazine)	1.1	58.44	51.32	151.15	bdl	52.16	55.67	50.63	124.48	4.98	40.11
Cyanazine	0.2	bdl	0.11	0.47	bdl	bdl	bdl	0.12	0.28	bdl	bdl
Chloridazon	0.2	15.27	28.14	101.48	bdl	1.50	9.55	16.18	40.59	bdl	1.04
Metamitron	0.2	1.91	1.71	7.33	bdl	1.66	1.09	1.10	2.55	bdl	0.73
Terbutylazine	0.2	66.30	128.74	694.32	0.35	5.32	52.11	92.82	234.50	0.57	4.96
Terbutylazine-2-hydroxy (OH-TER)	0.4	12.85	23.77	106.83	bdl	5.03	3.23	3.73	8.91	bdl	2.05
Terbutylazine-desethyl (DE-TER)	0.2	14.23	18.00	102.40	1.75	6.38	11.35	14.99	41.44	2.43	5.47
Terbutylazine-desethyl-2-hydroxy (OH-DE-TER)	1.1	5.62	13.73	65.57	bdl	bdl	1.29	1.51	3.51	bdl	bdl
Metolachlor	0.2	16.11	33.05	171.53	bdl	bdl	12.96	23.86	59.29	bdl	bdl
2-ethyl-6-methylaniline	1.1	2.48	2.45	7.43	bdl	2.21	1.81	1.26	3.40	bdl	1.98
Alachlor	0.2	2.58	4.95	20.86	bdl	bdl	2.38	4.88	12.20	bdl	bdl
2,6-Diethylaniline	1.1	4.97	3.95	18.70	bdl	3.58	2.30	1.90	5.66	bdl	1.87
Molinate	0.6	20.35	32.35	121.13	0.68	5.38	30.65	70.97	175.51	0.82	1.51

Figura 2.3. valori delle concentrazioni di erbicidi nella zona superiore della colonna d'acqua nella Sacca di Goro durante un anno (Carafa et al.2007)

I campionamenti effettuati da maggio 2004 a giugno 2005 hanno sottolineato come le concentrazioni di terbutilazina rilevate varino in maniera evidente in base alla stagione, con picchi in primavera (Fig. 2.4.)

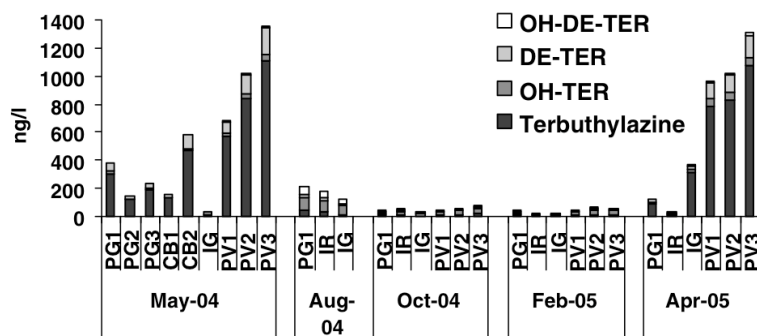


Figura 2.4. Concentrazioni di terbutilazina durante il periodo di studio nei diversi siti di campionamento (Carafa et al.2007).

3. Effetto degli erbicidi sulle microalghe

3.1. Alterazione dell'attività fotosintetica

L'utilizzo di erbicidi in agricoltura è notevolmente aumentato negli ultimi decenni, con un conseguente inquinamento massivo dell'acqua e del suolo. Circa il 40% degli erbicidi (derivati di phenylurea, triazine, diazine e fenoli) che sono tutt'ora in uso inibiscono la fase luminosa della fotosintesi, prendendo di mira il flusso di elettroni fotosistema II dipendente. Il fotosistema II (PSII) è un complesso di molteplici unità proteina-pigmento che catalizza, attraverso il trasferimento indotto dalla luce, gli elettroni dall'acqua al plastochinone (PQ). Il chinone trasportatore che supporta il trasferimento di elettroni è dislocato sulla proteina D1 del centro di reazione. Questo complesso proteico è costituito da 25 polipeptidi, che raccolgono la luce attraverso il complesso proteine-clorofilla (LHCII), da un centro di reazione e dai sistemi di reazione dell'acqua, chiamati anche "oxygen evolving complex" (OEC) (fig.2.5.).

Il centro di reazione del PSII è stato isolato nel 1987 ed è stato visto come il complesso fosse in grado di mantenere il legame con l'erbicida. L'affinità di legame dell'erbicida dipende dalla composizione aminoacidica nel loop idrofilico della proteina D1. La proteina D1 del centro di reazione del fotosistema II è l'obiettivo principale degli erbicidi che inibiscono la fotosintesi. Gli erbicidi fotosintetici sono suddivisi in tre grandi gruppi: fenilurea, triazine e fenoli a seconda della loro struttura chimica e delle proprietà di legame. Anche se tutte e tre le classi di erbicidi rimpiazzano l'accettore Q_B sulla proteina D1, interagiscono con residui aminoacidici diversi sulla D1. (Giardi et al. 2001)

L'inibizione della fotosintesi da parte degli inibitori del PSII può essere stimata utilizzando un fluorimetro PAM ("pulse amplitude modulation"), una tecnica rapida e non invasiva che ben si adatta per investigare la variabilità dell'efficienza fotochimica. Una porzione dell'energia luminosa assorbita dal PSII può non essere utilizzata per guidare il trasporto degli elettroni ed è dissipata come calore o come fluorescenza. Il PAM misura questa fluorescenza che viene utilizzata poi per determinare il rendimento quantico effettivo (yeld), un parametro proporzionale all'efficienza

fotosintetica del fotosistema II. L'inibizione dello yield è usata per esaminare la tossicità degli erbicidi su una grande varietà di alghe. (Magnusson et al. 2008)

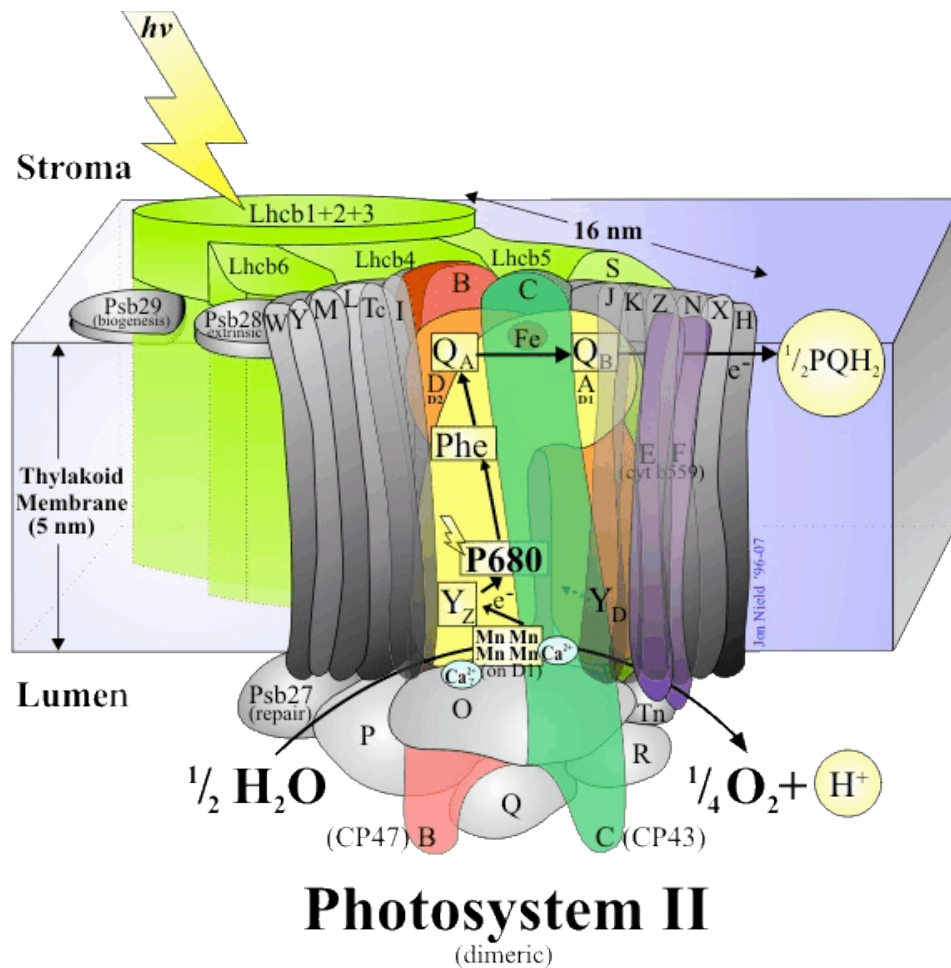


Figura 2.5. Fotosistema II, su cui interferisce l'erbicida terbutiazina

3.2. Alterazione delle comunità fitoplanctoniche

La riduzione del tasso di crescita e della biomassa microalgale può cambiare la composizione della comunità dei microorganismi, alterando così la disponibilità e la qualità di cibo degli erbivori. Inoltre cambiamenti di contenuto in termini di proteine e pigmenti possono portare al cambiamento dei valori nutrizionali delle microalghe. (Magnusson et al. 2008)

Effetti dannosi dei pesticidi su specie microbiche possono avere successivamente impatti anche sui livelli trofici più alti. Per esempio cambiamenti nella composizione macromolecolare di specie fitoplanctoniche e nelle composizioni delle comunità possono influenzare il tasso di crescita dei pascolatori (erbivori). Molte classi di erbicidi, come le triazine, agiscono inibendo la reazione di Hill del trasporto degli elettroni.

In studi relativi agli effetti dell'erbicida atrazina (un erbicida s-triazinico, usato principalmente per il controllo di piante di latifoglie e infestanti in genere) sulla naturale composizione del plancton, Hamilton et al. (1988) hanno osservato una diminuzione della produttività e della biomassa algale di 20 $\mu\text{g/L}$ dopo 7 giorni e una significativa riduzione nella diversità di specie fitoplanctoniche in un lago chiuso con 100 $\mu\text{g/L}$ di atrazina. Cambiamenti nella composizione delle comunità sono stati riportati in molti studi, ma la sensibilità relativa dei differenti taxa non è consistente. In studi sui mesocosmi, alghe verdi e flagellate planctoniche si sono ridotte, mentre criptofite e crisofite sono aumentate in abbondanza. Hamilton et al. (1988) hanno misurato una riduzione in alghe verde, diatomee e dinoflagellate in comunità chiuse di fitoplancton sottoposte a 100 $\mu\text{g/L}$ di atrazina, mentre le crisofite non sono state influenzate dall'erbicida e le criptofite sono leggermente aumentate. (De Lorenzo et al. 2001).

In diversi studi (Salomon et al. 1996; Hoagland et al. 1993; Hamala & Kolling 1985; Juttner et al. 1995) si è visto come gli erbicidi triazinici, e in particolare l'atrazina, vadano a influenzare mesocosmi e microcosmi. Ad esempio un'esposizione prolungata di atrazina con concentrazioni superiori alle 0,046 $\mu\text{mol L}^{-1}$ comporta un'aumento della tolleranza all'erbicida da parte della comunità algale, o in generale si è osservato un cambiamento della composizione, con dominanza di alghe verdi, piuttosto che di diatomee.

3.3. Influenza dei fattori ambientali sulla tossicità

Poiché la struttura tassonomica delle comunità algali è fortemente influenzata da molte variabili ambientali, dovremmo aspettarci un effetto indiretto dei fattori ambientali sulla sensibilità a sostanze tossiche come l'atrazina, delle comunità naturali. Ad esempio Barreiro e Pratt (1994) hanno scoperto che l'aggiunta di nitrati e fosfati rafforza la capacità del periphyton naturale di superare lo stress causato dal diserbante diquat. Mayasich et al (1986) ha dimostrato che la tossicità dell'atrazina aumenta, nelle colture di alghe, con l'aumentare della luce e della temperatura dell'acqua. Una relazione tra la l'intensità luminosa e la tossicità dell'atrazina è stata notata anche da Guasch e Sabater (1998) nelle comunità naturali di periphyton.

Perciò è essenziale identificare le variabili ambientali che influenzano la sensibilità delle comunità ambientali alle sostanze tossiche. Inoltre sono stati identificati alcuni fattori biologici indici di sensibilità all'atrazina nei sistemi lotici: comunità periphyton dominate da diatomee sono più tolleranti di comunità dominate da crisofite e alghe verdi. Infatti è stato visto in diversi studi che le diatomee sono tolleranti all'atrazina così come all'inquinamento organico. E' difficile stabilire se l'inquinamento organico affligge la sensibilità delle comunità naturali, interferendo con la biodisponibilità della sostanza tossica o proteggendo in qualche modo le alghe dall'esposizione all'atrazina. (Guasch et al. 1998)

OBIETTIVI

Il fitoplancton è costituito da organismi molto importanti per l'ambiente marino e molto diversificati, sia dal punto di vista morfologico che fisiologico, in quanto appartenenti a varie categorie tassonomiche.

Questi organismi sono normalmente soggetti alle variazioni stagionali e a quelle dell'ambiente verso cui presentano risposte diversificate; negli ultimi tempi a queste variabili si deve aggiungere l'alterazione dell'ambiente dovuta ad attività umane unita a fenomeni più ampi come il cambiamento climatico.

Il lavoro svolto in questa tesi si inserisce in un contesto più ampio di ricerca volto alla modellizzazione della crescita algale in presenza di inquinanti e di variazioni di temperatura, quali quelle che si possono attendere dai cambiamenti climatici in atto. Il fine ultimo del progetto sarà quello di effettuare confronti tra i dati sperimentali ottenuti in laboratorio e le simulazioni effettuate con un modello numerico di ecosistema per ottenere parametrizzazioni della crescita algale in diverse condizioni ambientali e poter prevedere conseguenze future.

Per quanto riguarda l'inquinante, si è scelto di studiare una categoria di inquinanti organici, in particolare gli erbicidi. Questi composti infatti hanno come target specifico della loro azione i vegetali terrestri coltivati tuttavia, arrivando al mare tramite dilavamento, si pensa che possano influenzare anche la crescita dei vegetali marini. Tra gli erbicidi è stata scelta la terbutilazina, uno dei composti più utilizzati nella Pianura Padana e più abbondante nelle acque superficiali ma su cui non si avevano dati riguardanti un eventuale effetto sulla crescita di microalghe marine.

Uno studio precedente aveva preso in considerazione la diatomea *Skeletonema marinoi*, tipicamente presente nel nord Adriatico a fine inverno-inizio primavera con fioriture abbondanti.

In questa tesi è stata presa in considerazione la categoria delle flagellate, comprendente alghe molto diverse dal punto di vista tassonomico e che si differenziano dalle diatomee per la motilità, la diversa composizione chimica e le condizioni ottimali di crescita (stagionalità, idrodinamismo, temperatura e altro).

Lo studio è stato eseguito con diverse specie microalgali coltivate in laboratorio e fatte crescere in condizioni di luce e nutrienti costanti, con l'aggiunta di diverse concentrazioni di terbutilazina. L'effetto dell'inquinante è stato inoltre studiato a due diverse temperature.

Il lavoro è stato suddiviso in due fasi:

- Una prima fase di screening, necessaria per scegliere le alghe da studiare e le concentrazioni di terbutilazina da utilizzare. Sono state scelte alcune flagellate tra quelle più comunemente presenti nel Nord Adriatico. In questa prima analisi l'effetto della terbutilazina è stato valutato esclusivamente tramite misure dell'efficienza fotosintetica effettuate con un fluorimetro PAM. L'obiettivo dello screening era quello di individuare le specie sensibili alle concentrazioni minori.
- Una seconda fase in cui la terbutilazina è stata aggiunta alle colture di due sole specie algali. In questo caso si è approfondito lo studio dell'effetto dell'inquinante attraverso una serie di analisi volte ad individuare le risposte in termini di crescita e di fisiologia delle alghe quali: l'efficienza fotosintetica, il consumo di nutrienti, la quantità di clorofilla e di polisaccaridi extracellulari prodotti. Per entrambe le alghe le colture sono state effettuate alla temperatura di 20 e 25°C.

MATERIALI E METODI

4. Culture algali

4.1. Mantenimento dei ceppi algali

Tutti i ceppi algali vengono fatti crescere in beute sterili di diverse dimensioni poste in una camera termostatica impostata alla temperatura di $20 \pm 1^\circ\text{C}$ e provvista di lampade fluorescenti con un'intensità luminosa pari a $90 \mu\text{E cm}^{-2} \text{s}^{-1}$; Il fotoperiodo è regolato da un timer che fornisce 16 ore di luce e 8 ore di buio.

Tutto il materiale che viene utilizzato quotidianamente per gli esperimenti e per il mantenimento delle alghe in coltura deve essere sterilizzato in autoclave a 1 atm per 20 minuti ad una temperatura di 120°C ed ogni procedura che preveda la manipolazione delle colture deve essere svolta sotto cappa a flusso laminare.

4.2. Culture “batch”

La coltura viene preparata inoculando piccole quantità dell'alga in beute contenenti il terreno di coltura adatto per la specie scelta. Nelle colture “batch” si segue l'andamento della crescita dell'alga dal giorno dell'inoculo (giorno zero) fino al loro esaurimento, senza aggiunta di nutrienti e di alghe. Queste colture sono semplici da allestire ed inoltre danno la possibilità di studiare simultaneamente gli effetti delle diverse condizioni di crescita su varie popolazioni di cellule algali, che derivano dalla stessa coltura e presentano quindi le stesse condizioni fisiologiche iniziali.

4.3.Terreno di coltura

Il terreno di coltura più utilizzato per la crescita di ceppi algali è il Medium F/2 (Guillard and Ryther,1962) al quale possono essere apportate modifiche per quanto riguarda la concentrazione di N e P ad esempio, scegliendo concentrazioni 7,6 volte più basse di N e 5 volte più basse di P rispetto a quelle tipiche del terreno F/2, si ricrea una condizione più vicina a quella del mare Adriatico, e un rapporto di Redfield N:P di 16:1 . (tab. 4.1.)

Tabella 4.1. Composizione del terreno F (N/15.2, P/10) secondo Guillard and Ryther.

Nutrienti	Soluzioni Madri	Concentrazione finale (M)
NaNO ₃	7,5 gr / 100ml	$8,82 \cdot 10^{-4}$
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	0,5 gr / 100 ml	$3,62 \cdot 10^{-5}$
Micronutrienti		
Na ₂ EDTA	4,36 gr / 100 ml	$1,17 \cdot 10^{-5}$
FeCl ₃ 6H ₂ O	3,15 gr / 100 ml	$1,17 \cdot 10^{-5}$
CuSO ₄ 5H ₂ O	0,98 gr / 100 ml	$3,93 \cdot 10^{-5}$
ZnSO ₄ 7H ₂ O	2,20 gr / 100 ml	$7,65 \cdot 10^{-8}$
COCl ₂ 6H ₂ O	1,00 gr / 100 ml	$4,20 \cdot 10^{-8}$
MnCl ₂ 4H ₂ O	18,00 gr / 100 ml	$9,10 \cdot 10^{-7}$
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	0,63 gr / 100 ml	$2,60 \cdot 10^{-8}$
Na ₂ SeO ₃	1,73 gr / 100 ml	$1 \cdot 10^{-8}$
Vitamine		
Tiamina HCl	20 mg	$2,96 \cdot 10^{-7}$
Biotina	10 mg/96 ml 1 ml	$2,05 \cdot 10^{-9}$
B ₁₂	10 mg/8,9ml 0,1 ml	$3,69 \cdot 10^{-10}$
Soluzione tampone		
HEPES	23 g / 100 ml	$9,58 \cdot 10^{-4}$

Prima di tutto si preparano i nutrienti, in seguito vengono posti in autoclave per sterilizzarli, ad esclusione delle vitamine, che essendo termolabili, vengono sterilizzate tramite filtrazione (con filtri Millipore di porosità 0,22 µm in grado di trattenere la componente batterica) sotto cappa sterile.

Il terreno viene preparato utilizzando come base acqua di mare oligotrofica, prelevata al largo di Cesenatico (Adriatico). L'acqua viene lasciata

invecchiare all'interno di taniche poste in un ambiente buio e fresco. Quando viene utilizzata, deve essere filtrata con un sistema di filtrazione a vuoto e filtri GF/C (Whatman) in microfibra di vetro e con maglia 1,2 μm ; successivamente si misura la salinità iniziale (S_i) dell'acqua filtrata tramite il rifrattometro Agato S/10 (presenta un errore di $\pm 1\%$), e in base alla salinità finale (S_f) che si vuole ottenere si diluisce con acqua deionizzata utilizzando la seguente formula:

$$\sigma = \frac{\rho \times S_i}{S_f}$$

σ = volume di H_2O di mare in ml da utilizzare

ρ = volume totale di H_2O di mare in ml che voglio ottenere

$\rho - \sigma$ = volume di H_2O deionizzata in ml da aggiungere

L'acqua diluita in base alla salinità voluta, viene poi messa in bottiglie di vetro che poste in autoclave a 1 atm per 20 minuti ad una temperatura di 120°C vengono sterilizzate. Quando la temperatura dell'acqua è sufficientemente diminuita (a temperatura ambiente) e lavorando sempre in condizioni di sterilità, è possibile aggiungere i nutrienti. In particolare per ogni 995 ml di acqua di mare filtrata e sterilizzata vengono aggiunti gli elementi in tabella 1 con concentrazioni che portano la soluzione finale ad un volume di 1 L.

4.4. Inoculo

L'inoculo da effettuare per ogni specie algale dipende da diversi fattori: le cellule su millilitro presenti nella beuta madre al giorno 0 (C_{bm}), le cellule su millilitro da cui vuole partire (C), i millilitri di inoculo che si devono prelevare (I) e il volume totale della beuta da utilizzare per l'esperimento (V_t).

A seconda della microalga che si sta utilizzando e quindi del numero di cellule su ml con cui si vuole partire, si utilizza la seguente formula:

$$I = \frac{V_t \times C}{C_{bm}}$$

Il numero di cellule di partenza è specifico per ogni alga e si ottiene dalle curve di crescita in letteratura.

4.5. Preparazione della soluzione di Terbutilazina

La soluzione madre di erbicida (SOLUZIONE 1, 2000 mg/L) è stata preparata sciogliendo 10 mg di Terbutilazina in 5 ml di metanolo (CH_3OH). Da questa soluzione sono state effettuate ulteriori diluizioni con metanolo per testare le microalghe a concentrazioni inferiori di erbicida (Tab. 4.2.).

Tabella 2.2. soluzioni di terbutilazina utilizzate e relative concentrazioni.

SOLUZIONE	SOLUZIONE PER LITRO (mg/l)	DILUIZIONE CON 1 ml di CH_3OH
1	2000	-
2	1000	1 ml di soluzione 1
3	500	1 ml di soluzione 2
4	250	1 ml di soluzione 3
5	125	1 ml di soluzione 4

5. Disegno Sperimentale

Le alghe utilizzate nello screening preliminare e successivamente negli esperimenti a 20° C e 25° C sono state fatte crescere ad una salinità di 35 ‰, nel terreno di coltura sopra descritto. Inoltre sono state mantenute all'interno di una camera termostatica con fotoperiodo di 12 ore e intensità luminosa di 140 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

5.1. Screening preliminare

Per scegliere le flagellate da utilizzare negli esperimenti è stato effettuato uno screening su diverse flagellate tipiche del Mar Adriatico alla temperatura di 20°C. Ognuna di queste è stata testata a 2 concentrazioni di erbicida (25 e 50 $\mu\text{g/L}$). Per ciascuna microalga era presente una beuta di controllo, dove non era presente Terbutilazina.

Le microalghe utilizzate per questa fase iniziale sono:

- *Prorocentrum micans*
- *Prorocentrum minimum*
- *Gonyulax spinifera*
- *Lingulodinium polyedrum*
- *Protoceratium reticulatum*
- *Alexandrium lusitanicum*
- *Scrippsiella trochoidea*
- *Fibrocapsa japonica*
- *Heterosigma hakashiwo*

Le specie algali che si sono dimostrate maggiormente sensibili all'erbicida (*Gonyaulax spinifera*, *Fibrocapsa japonica*, *Lingulodinium polyedrum*) sono poi state sottoposte ad uno screening più accurato, con un range più numeroso di basse concentrazioni di terbutilazina: 0,5 $\mu\text{g/L}$, 1 $\mu\text{g/L}$, 5 $\mu\text{g/L}$, 10 $\mu\text{g/L}$ e 15 $\mu\text{g/L}$ (tab. 5.1..).

Tab 5.1.. concentrazioni di erbicida e relative percentuali di metanolo utilizzate per lo screening, in base al volume della beuta

Concentrazione erbicida (µg/L)	Soluzione	Volume di soluzione (µl)	% CH ₃ OH
0,5	5	1,6	0,0004
1	5	3,2	0,0005
1,9	4	3	0,00075
5	2	2	0,0005
10	2	4	0,0025
15	1	3	0,00075
25	1	5	0,00125
50	1	10	0,0025

Durante lo screening è stato fatto un test aggiungendo solo diverse concentrazioni di metanolo per accertare che il solvente utilizzato nella preparazione della soluzione di Terbutilazina non avesse effetti sulla crescita algale. In particolare è stato valutato un range di concentrazioni compreso fra 0,0005% e 0,003%, molto maggiore rispetto alle percentuali poi realmente utilizzate nell'esperimento, comprese fra 0,0001% e 0,0015%.

Per studiare l'effetto della Terbutilazina e del metanolo sulla crescita algale è stata stimata l'efficienza fotosintetica mediante l'utilizzo del fluorimetro PAM. Sulle microalghe sono stati effettuate analisi giornaliere di torbidità e conteggi di cellule.

5.2. Esperimenti

In base ai risultati ottenuti dagli screening effettuati, sono state scelte due specie algali (*G.spinifera* e *P.minimum*) da sottoporre alle concentrazioni di terbutilazina prescelte e analizzare le risposte in modo più completo e approfondito, a diverse condizioni di temperatura (tab. 5.2.)

G. spinifera è stata presa in considerazione in quanto si è rivelata la microalga più sensibile a concentrazioni di erbicida più vicine a quelle ambientali, fra tutte le alghe valutate; per quanto riguarda la scelta di *P. minimum* invece è stato considerato il fatto che questa microalga è fra le dinoflagellate più frequenti e rappresentative del mar Adriatico (Aubry et al.2004), anche se non particolarmente sensibile, infatti è stata usata una concentrazione di erbicida molto maggiore rispetto a quelle normalmente ritrovate in ambiente marino.

Prima di iniziare gli esperimenti è stata effettuata una fase di adattamento, dove le alghe sono state fatte crescere nella camera termostatica posta alle temperature di 20 o 25°C , ad un' intensità luminosa $140 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, con un alternanza buio-luce di 12 ore.

Per entrambe le alghe gli esperimenti sono stati fatti in doppia replica.

Tabella 5.2. Disegno sperimentale utilizzato per *G.spinifera* e *P.minimum* con relative concentrazioni di erbicida e percentuali di metanolo aggiunte.

Alga	Volume: terreno- inoculo- erbicida	Concentrazione erbicida	Replica	Soluzione	Volume di soluzione	% CH ₃ OH
<i>G.spinifera</i>	1900 ml	C	A	-	-	-
		C	B	-	-	-
		1 µg/L	A	2	1,85µl	0,0001
		1 µg/L	B	2	1,85µl	0,0001
		5 µg/L	A	2	9,25µl	0,0005
		5 µg/L	B	2	9,25µl	0,0005
<i>P.minimum</i>	850 ml	C	A	-	-	-
		C	B	-	-	-
		30 µg/L	A	1	13,5µl	0,0015
		30 µg/L	B	1	13,5µl	0,0015

Giornalmente è stata valutata la crescita algale sia indirettamente mediante analisi della torbidità (a 750 nm) che con il conteggio cellulare; il relativo consumo di nutrienti è stato misurato ogni due giorni circa e il rilascio di polisaccaridi nel mezzo a intervalli più ampi. Inoltre giornalmente è stata stimata la clorofilla, mediante metodo colorimetrico, e l'efficienza fotosintetica con fluorimetro PAM.



Figura 5.1. Esperimento con *G. spinifera*.

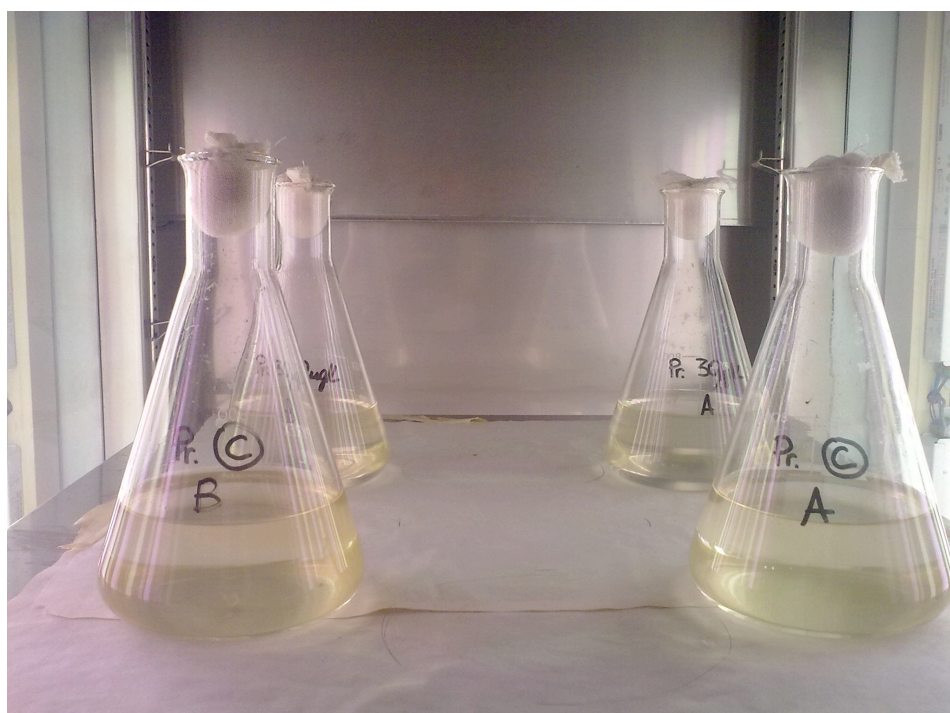


Figura 5.2. Esperimento con *P. minimum*

6. Metodi di analisi per la valutazione della crescita algale e dell'attività foto sintetica

6.1. Curva di crescita

La crescita delle cellule algali in colture con volume limitato e nutrienti necessari, poste in adatte condizioni di luce, temperatura presenta un andamento tipico, che consta di quattro fasi (fig. 6.1.):

1. Fase *lag* durante la quale l'alga si adatta al nuovo ambiente che la circonda, per cui non vi è aumento del numero di cellule. La sua durata è variabile, a seconda delle dimensioni dell'inoculo, delle condizioni fisiologiche della cellula algale e delle condizioni di coltura.
2. Fase *esponenziale*, nella quale si ha una rapida crescita cellulare con andamento logaritmico. E' rappresentata dal tratto di curva con pendenza maggiore
3. Fase *stazionaria*, nella quale diminuisce il tasso di crescita della coltura, in conseguenza all'esaurimento dei nutrienti. Il numero di cellule rimane pressoché costante e la fase può durare diverse settimane.
4. Fase di *declino* o di *morte della coltura*. In questa fase i nutrienti si esauriscono sempre di più, e le cellule cominciano a morire, si lisano ed il loro numero totale diminuisce progressivamente.



Figura 6.1. Esempio di curva di crescita

E' possibile calcolare la velocità di crescita specifica prendendo due punti della curva di crescita durante la fase esponenziale, quando la curva mostra la massima pendenza. I due valori di N scelti, N_1 e N_2 , corrispondono sull'asse delle ascisse al tempo misurato in giorni, rispettivamente t_1 e t_2 , e sull'asse delle ordinate al numero di cellule su millilitri di coltura filtrati. Il tasso di crescita, μ , può essere misurato applicando la seguente formula:

$$\mu = \frac{\ln\left(\frac{N_2}{N_1}\right)}{t_2 - t_1}$$

6.2. Conteggio delle cellule

Uno dei metodi più semplici per stimare l'aumento di biomassa algale è quello di contare le cellule presenti in un determinato volume d'acqua.

Giornalmente sono stati prelevati 5 ml di campione da ciascuna beuta e fissati con una soluzione di Lugol. Da questi viene prelevato 1 ml, che posto in un'apposita camera di sedimentazione viene lasciato depositare per almeno venti minuti. Il conteggio si effettua utilizzando un microscopio rovesciato (Axiovert 100 della Zeiss), con un obiettivo 32x ed un oculare 10x, in modo tale che le dimensioni reali della cellula siano ingrandite di 320 volte.

La modalità di conteggi utilizzata è quella per strisciata. Nel conteggio per strisciata si contano le cellule algali sedimentate che si trovano comprese in un rettangolo che ha come dimensioni (*a*) il lato del reticolo posto nell'oculare e (*b*) il diametro della camera di sedimentazione. E' buona norma contare lungo diversi diametri per diminuire l'errore di conteggio. Nei nostri esperimenti abbiamo contato le cellule algali almeno lungo cinque diametri della camera di sedimentazione.

Si procede calcolando la media delle alghe contate nei diversi diametri e si moltiplica per un fattore (*F*) del valore di 60,774, ottenendo così il numero di cellule algali presenti in un millilitro di coltura. Il fattore *F* è calcolato in base al rapporto tra l'area della camera di sedimentazione e l'area del rettangolo (*axb*) (figura 6.2.).

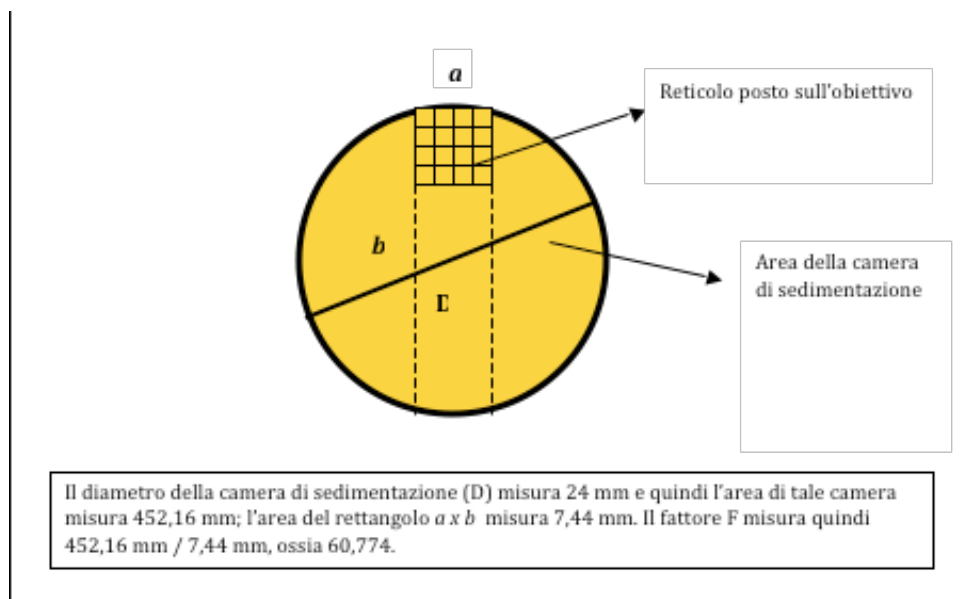


Figura 6.2. Schema del conteggio per strisciata e calcolo del fattore F.

6.3. Analisi di torbidità

Giornalmente vengono prelevati 4 ml dalla coltura opportunamente agitata affinché il campione sia omogeneo. Le letture spettrofotometriche si effettuano alla lunghezza d'onda di 750 nm., in quanto a questo valore non si ha assorbimento da parte della clorofilla e viene evidenziata solo la torbidità della sospensione. Alla torbidità di ciascun campione viene sottratta quella misurata sul terreno di coltura tal quale, che ha quindi la funzione di bianco.

6.4. Misura dell'attività fotosintetica tramite fluorimetro PAM

L'energia assorbita dalla clorofilla va incontro a tre diversi destini: utilizzata per la fotosintesi (fotochimica), dissipata come calore o riemessa come fluorescenza, ovvero come fotoni con una lunghezza d'onda maggiore. Attraverso il fluorimetro PAM che emette luce ad impulsi modulati è possibile effettuare misura della fluorescenza emessa dal fotosistema II che permette di valutare l'efficienza fotosintetica delle cellule.

Kautsky nel 1930 ha osservato come le alghe in seguito ad una leggera illuminazione, che non stimoli la fotosintesi, mostrino un aumento di fluorescenza da zero a un livello basso costante detto F_0 . F_0 cresce fino al livello massimo F_m se l'illuminazione è abbastanza forte. La differenza fra F_m e F_0 è detta fluorescenza variabile F_v (Kautsky and Hirsch, 1931).

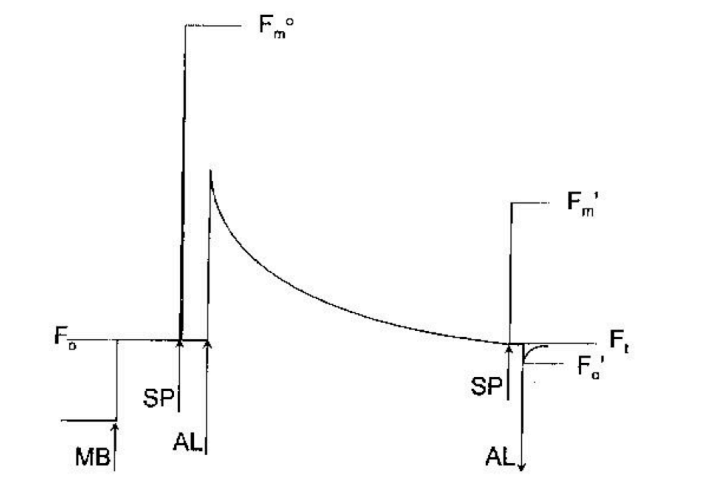


Figura 6.3. Fluorescenza emessa dalle alghe in seguito ai diversi impulsi luminosi somministrati.

Vengono prelevati 5 ml di coltura e la sospensione, in seguito all'adattamento al buio per 20 minuti, viene posizionata in una cuvetta all'interno dello strumento e illuminata da un raggio di luce (MB) (figura 5) sufficiente a stimolare la fluorescenza ma non la fotosintesi; questo valore che si ottiene è il livello minimo di fluorescenza F_0 (ovvero quando si hanno tutti i centri di reazione aperti e disponibili per la fotosintesi). Successivamente si dà un lampo di luce saturante SP (luce ad alta intensità

maggiore di $2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) che riduce gli accettori del fotosistema II e otteniamo F_m ovvero un valore massimo di fluorescenza. Da queste misure otteniamo il rendimento quantico massimo del PSII, ovvero quando tutti i centri di reazione sono aperti:

$$\frac{F_v}{F_m} = \frac{(F_m - F_0)}{F_m}$$

In seguito viene fornita una luce attinica (AL) (fig. 6.3.) tale da permettere la fotosintesi, si può osservare un aumento transitorio di fluorescenza a causa della riduzione dei chinoni e all'intervallo di tempo necessario per far iniziare l'organizzazione del carbonio (in quanto gli enzimi deputati alla fissazione necessitano di essere attivati dalla luce). Fornendo una luce continua la fluorescenza diminuisce in quanto inizia la fotosintesi (quenching fotochimico) e si raggiunge un valore costante F_t ; se dopo un certo intervallo di tempo (in genere 5 min) viene fornito un altro impulso luminoso di luce saturante (SP) che permette di ottenere il valore della fluorescenza massima del campione alla luce F_m' in genere più basso del valore del campione adattato al buio F_m .

$$\frac{(F_m' - F_t)}{F_m'}$$

Lo strumento ci fornisce il rendimento quantico effettivo del trasferimento di elettroni a livello del fotosistema II, cioè misura in quale proporzione viene utilizzata per la fotosintesi la luce assorbita dalla clorofilla (efficienza dei centri di reazione del PSII alla luce). Questo valore riferito alle $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (di luce) assorbite serve a individuare la capacità fotosintetica in vivo (in quanto è una misura dello stato di salute delle cellule). La differenza tra F_m e F_m' invece ci dà un'idea dell'energia dissipata come calore.

Inoltre possiamo ottenere i valori rappresentativi del quenching fotochimico $(F_m' - F_t)/(F_m' - F_0')$, che riflette lo stato redox dell'accettore primario del PSII, ovvero il QA; e il quenching non fotochimico $(F_m - F_m')/(F_m - F_0)$, cioè

l'energia dissipata come calore legata all'energizzazione della membrana dei tilacoidi (ciclo delle xantofille).

Quando le colture raggiungono elevati valori di efficienza fotosintetica, ovvero nei giorni degli esperimenti in cui il rendimento quantico assume i valori più alti, dopo l'abituale adattamento al buio viene misurato il rendimento quantico (yield) massimo e successivamente vengono forniti numerosi flash saturanti, con intervalli di un minuto per 15 minuti. Grazie a questa serie di impulsi si ottengono numerosi valori di F_m' e vengono eseguite le curve di induzione (fig. 6.4.) che permettono di avere una stima più accurata del rendimento quantico effettivo e di ottenere altri parametri utili a valutare le risposte dell'apparato fotosintetico.

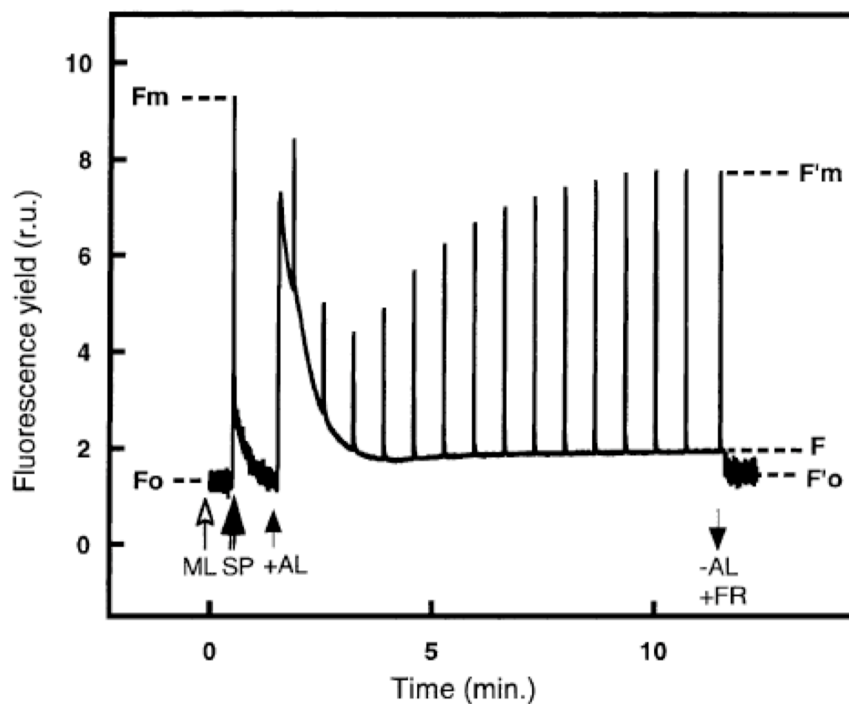


Figura 6.4. Andamento tipico della fluorescenza durante una curva di induzione. I differenti tipi di luce utilizzati durante le misurazioni sono indicati come ML=luce modulata, SP=impulso saturante, AL=luce attinica e FR=luce infrarossa

6.5. Analisi clorofilla a

Per entrambe le specie algali, sono stati prelevati quotidianamente volumi decrescenti, a partire dai 75 ml di coltura al giorno 0. I campioni prelevati vengono filtrati sotto vuoto, attraverso un filtro Millipore di cellulosa da 0,45 μm con un diametro di 47 mm, per raccogliere le cellule. Dopo la preparazione i campioni vengono conservati, avvolti in carta stagnola, a -

20°C per un tempo non superiore ad una settimana. Per effettuare l'analisi è necessaria una soluzione di acetone al 90%, che si ottiene mescolando una piccola dose di Na₂CO₃ anidro all'acetone puro. Si agita vigorosamente la beuta e si lascia decantare finché tutto il carbonato si deposita sul fondo e la soluzione diventa limpida; a questo punto si filtra il solvente con carta da filtro, si pone in un cilindro graduato e lo si diluisce con acqua distillata (10%), così da ottenere la soluzione di acetone al 90%. Dopo questa fase di preparazione si può procedere all'analisi della clorofilla. Il filtro, precedentemente congelato, viene posto in una provetta con 10 ml di soluzione acetonica al 90%; la provetta viene agitata vigorosamente su vortex per ottenere la completa dissoluzione del filtro. Il campione viene incubato al buio per 20 ore a 4°C e dopo la prima ora è agitato una seconda volta con vortex. Al termine del periodo di incubazione il campione va acclimatato al buio a temperatura ambiente per 15 minuti. Si aggiungono altri 5 ml di soluzione acetonica al 90% e si agita nuovamente. A questo punto i campioni vengono centrifugati a 3000 pm per 10 minuti ad una temperatura di 20°C, al termine vengono tenuti i sopranatanti. Si procede con l'analisi utilizzando uno spettrofotometro UV/VIS Jasco 7800. Si riempiono due cuvette con la soluzione acetonica al 90% e si effettua l'auto-zero, alle lunghezze d'onda di 665 nm e 750 nm, per la misura del bianco (b); a questo punto riempiendo la cuvetta anteriore con il campione (c) si effettuano le due letture a 665 nm e a 750 nm rispetto al bianco. La concentrazione di clorofilla a, espressa in mg/m³, viene infine calcolata con la seguente formula:

$$Chla = 11.9 * ABS_{665} * \frac{V}{V_f * L}$$

Dove ABS_{665} è l'assorbanza alla lunghezza d'onda di 665 nm, la variabile V rappresenta i millilitri di soluzione acetonica (15 ml), V_f è il volume di acqua di coltura filtrato, espresso in litri (100 ml = 0,1 L), e L è il cammino ottico della cuvetta (nel nostro caso = 1 cm).

Nella formula precedente ABS_{665} viene calcolato come:

$$ABS_{665} = (ABS_{665}^c - ABS_{665}^b) - (ABS_{750}^c - ABS_{750}^b)$$

Dove c corrisponde al campione esaminato e b al bianco con cui viene effettuato l'auto-zero.

6.6. Analisi dei nutrienti

I nutrienti analizzati costituiscono un'importante parte dell'esperimento volto ad osservare la crescita delle microalghe in coltura. Le analisi dei nutrienti (fosfati e nitrati) vengono effettuate sull'acqua di coltura filtrata e con i filtri utilizzati per le analisi della clorofilla e conservata in bottiglie di plastica con capacità di 250 ml, precedentemente lavate con acido cloridrico.

6.6.1. Analisi dei fosfati

Vengono posti in cilindri graduati 50 ml di acqua distillata (bianco), e 50 ml di terreno di ciascuna coltura precedentemente filtrata. In base al metodo di Strickland e Parsons (1968) viene preparato un reattivo misto, contenente molibdato ammonico, acido solforico, acido ascorbico e tartrato di potassio e antimonite. I campioni vengono fatti reagire con il reattivo misto, aggiungendo 5 ml di quest'ultimo in ogni cilindro, che vengono infine sigillati con parafilm e agitati vigorosamente. Dopo 10 minuti la reazione tra l'acqua e il reattivo misto fa sì che il campione assuma una colorazione blu, che varia in intensità a seconda della concentrazione di fosfati presenti. Più è alta la concentrazione di fosfati, più la colorazione della soluzione tenderà al blu. Si procede con l'analisi utilizzando uno spettrofotometro UV/VIS Jasco 7800, ad una lunghezza d'onda di 885 nm. Si riempiono entrambe le cuvette con il campione contenente acqua distillata e si effettua l'autozero. Si procede poi alla lettura dei campioni riempiendo la cuvetta anteriore con l'acqua di coltura ed effettuando la lettura a 885 nm a cui viene sottratto il valore del bianco.

6.6.2. Analisi dei nitrati

Per l'analisi dei nitrati, i campione prelevati e filtrati giornalmente vengono diluiti con acqua di mare sintetica fino al volume di 100 ml. Oltre ai campioni si prepara anche un bianco costituito esclusivamente da acqua di mare sintetica e uno standard, costituito da 100µl di soluzione standard di

nitrito portato a un volume di 100 ml con acqua di mare sintetica. Ai campioni, allo standard e al bianco così preparati sono aggiunti 2 ml di cloruro di ammonio concentrato (NH_4Cl) al 25%, e successivamente vengono passati in una colonna contenente cadmio ramato per la riduzione dei nitrati a nitriti. Nel passaggio attraverso la colonna di riduzione i primi 45 ml vengono scartati, mentre 50 ml vengono raccolti in cilindri graduati. Avvenuta la riduzione ai cilindri vengono aggiunti 2 ml di soluzione di SA (Solfanilammide all'1%) e dopo 3 minuti, 1 ml di soluzione di NEDA (Naftiletilendiammina allo 0,1%); si attende che avvenga la reazione colorimetrica per 15 minuti, quindi si misura l'assorbanza della soluzione a 543 nm contro acqua distillata, usando vaschetta con cammino ottico da 1 cm. Per la determinazione dei nitrati, occorre sottrarre ai valori di assorbanza ottenuti per i campioni il rispettivo valore del bianco e procedere alla determinazione del fattore F.

$$F = \frac{[N]diNO_3(0,14ppm)}{abs(st) - abs(bianco)}$$

Figura 7 Calcolo del fattore F per la determinazione dell'efficienza della colonnina (può disattivarsi man a mano che la si usa o se resta inoperosa per molto tempo).

Quando si impiega uno spettrofotometro il valore F dovrebbe avere un valore compreso tra 0,31 per un'efficienza del 100%, e 0,37, per un'efficienza dell'84%. Dopo il calcolo del fattore F la concentrazione dei nitrati si ottiene nel seguente modo:

$$mg/l(NdiNO_3) = \frac{F \cdot [abs(c) - abs(bianco)] \cdot 100}{V}$$

Figura 8 Concentrazione dei nitriti; F= fattore, abs (c)= assorbanza del campione corretta per i valori del bianco e per l'assorbanza dei nitriti, V= è il volume in ml di acqua in esame prelevata per l'analisi.

6.7. Determinazione dei polisaccaridi

Per la determinazione dei polisaccaridi vengono prelevati e filtrati, con filtro di cellulosa con porosità di 8 μm , 45 ml di coltura infine vengono conservati in freezer a -20°C .

vengono prelevati 15 ml di campione e posti in tubi di plastica adatti alla centrifuga, a cui vengono aggiunti 30 ml di etanolo (i restanti 30 ml vengono ricongelati per poter effettuare una triplica replica del campione). I tubi vengono poi chiusi con l'apposito tappo e sigillati con parafilm e mantenuti in freezer a -20°C per almeno 24 ore.

Successivamente i tubi vengono bilanciati 2 a 2 con etanolo e centrifugati a 4°C a 12000 rpm per 15 minuti; il sopranatante ottenuto dalla centrifugazione viene eliminato, mentre ad ogni pellet viene aggiunto 1 ml di acido solforico all'80%, ed i tubi vengono riposti a 20°C per 20 ore, agitandoli dopo qualche ora.

L'ultima fase dell'analisi prevede la diluizione del campione che viene portato ad un volume finale di 7 ml in apposite provette graduate.

L'analisi del campione viene effettuata in tripla replica. Il campione viene omogeneizzato e rimescolato con la pipetta e vengono prelevati 6 ml a loro volta suddivisi in 3 tubi di vetro. Oltre ai tubi con 2 ml di campione ciascuna replica, vengono preparati anche 3 bianchi mettendo 2 ml acqua distillata in tre tubi.

A questo punto si impiega il metodo di Dubois (1956) che prevede l'utilizzo della miscela di fenolo e acido solforico: ad ogni replica (campione e bianco) vengono successivamente aggiunti 50 µl di fenolo all'80% e immediatamente dopo 5 ml di acido solforico concentrato. I tubi così preparati vengono agitati con un vortex e si fanno riposare per 30 min a temperatura ambiente sotto cappa chimica. Infine si effettua una lettura spettrofotometrica ad una lunghezza d'onda di 485 nm. Il valore dei bianchi viene mediato e sottratto a quello dei campioni.

RISULTATI

7. Analisi preliminare della sensibilità di diverse microalghe flagellate dell'Adriatico alla terbutilazina

7.1. Effetto della terbutilazina sull'attività fotosintetica di 9 specie di microalghe.

Nella prima fase dello screening sono state valutati gli effetti di concentrazioni elevate di terbutilazina (TBZ) (25 µg/l e 50µg/l), sull'efficienza fotosintetica di 7 dinoflagellate (*P. minimum*, *P. micans*, *A. lusitanicum*, *S. trochoidea*, *G. spinifera*, *P. reticulatum*, *L. polyedrum*) e di 2 rafidoficee (*F. Japonica* e *H. hakashiwo*). Le misurazioni effettuate attraverso il fluorimetro PAM, sono state eseguite tutti i giorni fino al momento in cui si osservava il declino dell'efficienza fotosintetica, che solitamente avviene alla fine della fase esponenziale di crescita.

Di seguito sono riportati, per ciascuna specie, i grafici relativi al rendimento quantico massimo, misurato dopo l'adattamento delle microalghe al buio, e quelli relativi al rendimento quantico effettivo, misurato dopo esposizione alla luce per 5 min.

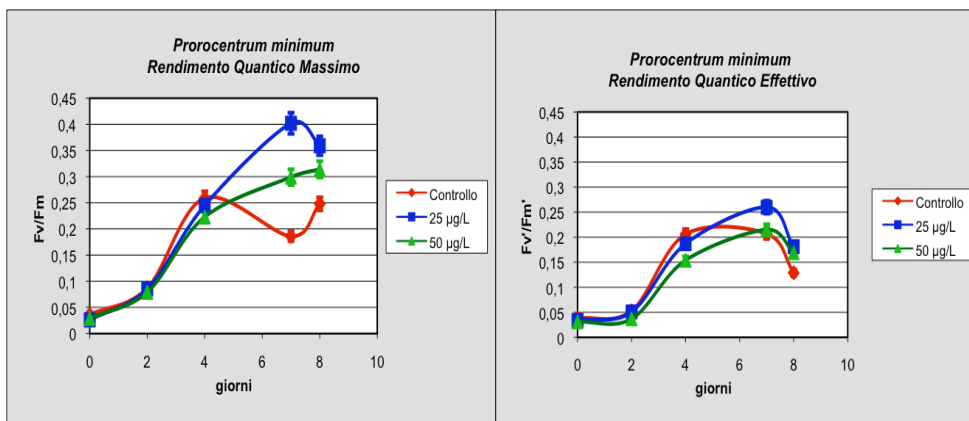


Figura 7.1 Rendimento quantico massimo ed effettivo di *P. minimum* a 20°C

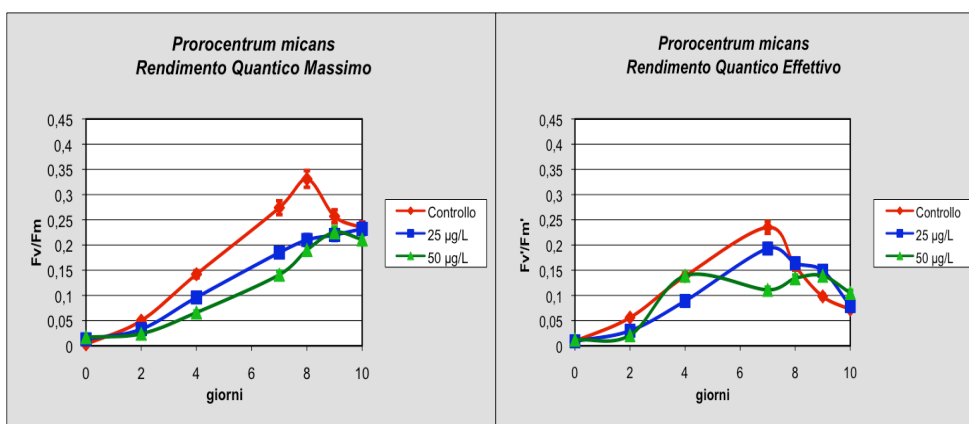


Figura 7.2. Rendimento quantico massimo ed effettivo di *P. micans* a 20°C

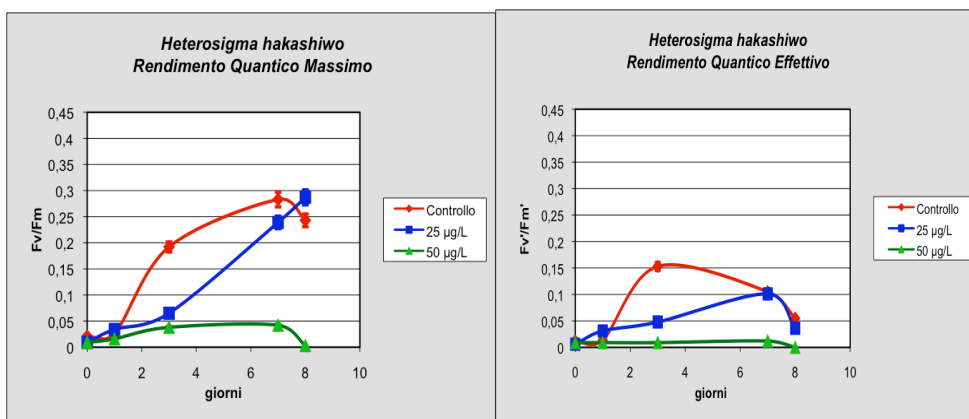


Figura 7.3. Rendimento quantico massimo ed effettivo di *H. hakashiwo* a 20°C

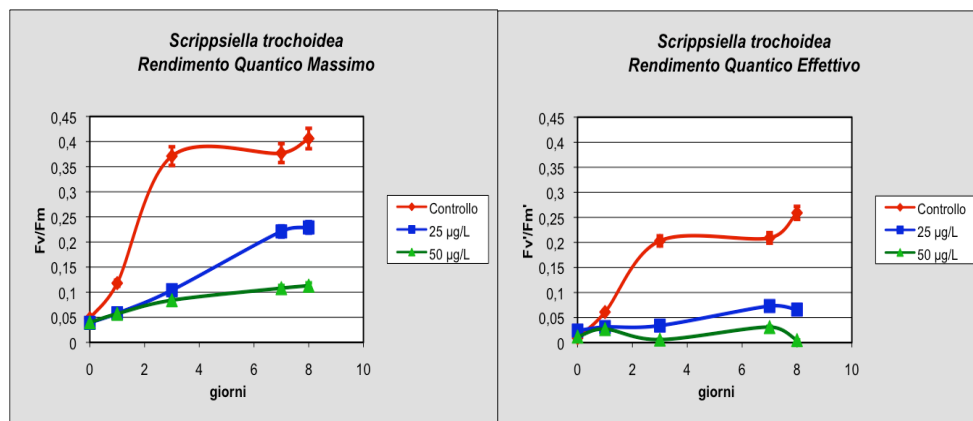


Figura 7.4. Rendimento quantico massimo ed effettivo di *S. trochoidea* a 20°C

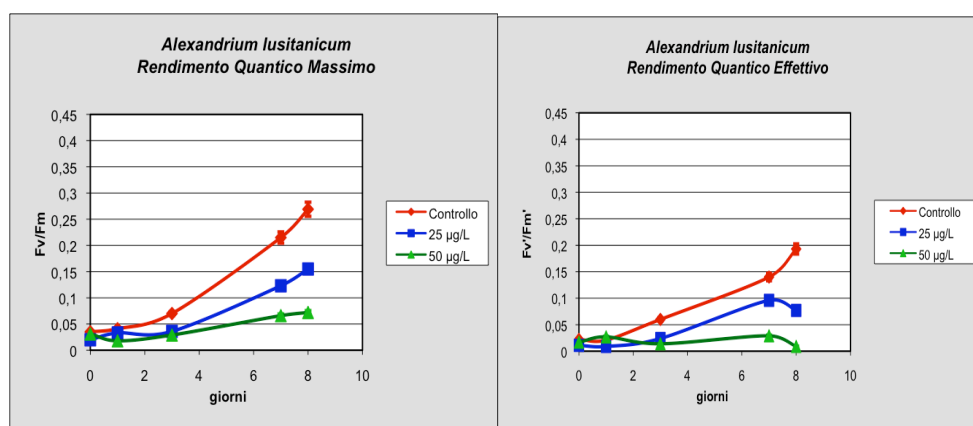


Figura 7.5. Rendimento quantico massimo ed effettivo di *A. lusitanicum* a 20°C

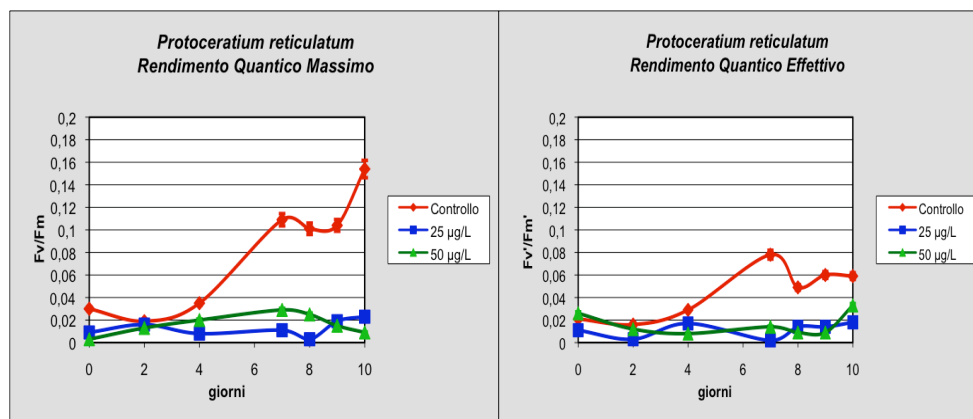


Figura 7.6. Rendimento quantico massimo ed effettivo di *P. reticulatum* a 20°C

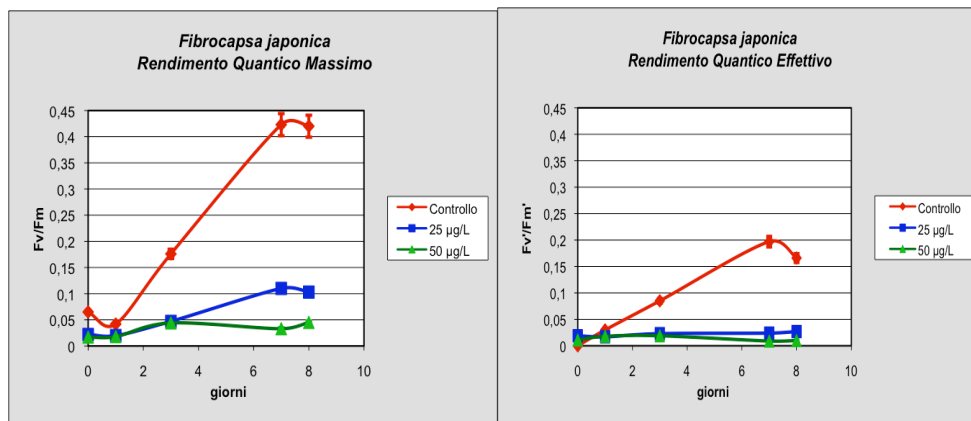


Figura 7.7. Rendimento quantico massimo ed effettivo di *F.japonica* a 20°C

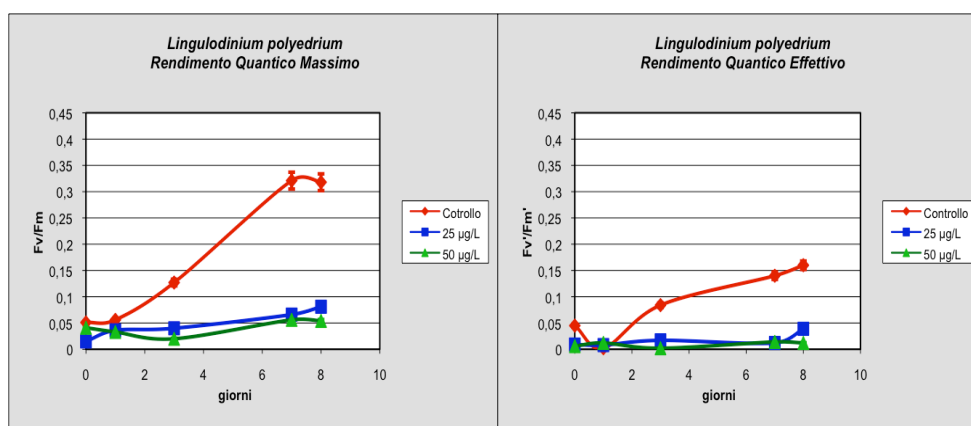


Figura 7.8. Rendimento quantico massimo ed effettivo di *L.polyedrum* a 20°C

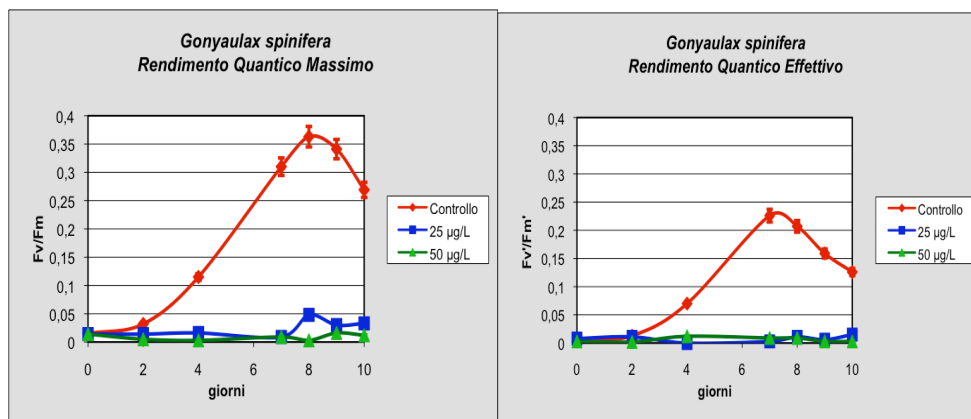


Figura 7.9. Rendimento quantico massimo ed effettivo di *G.spinifera* a 20°C

Per tutte e nove le microalghe si nota che l'andamento quantico massimo e quello effettivo hanno un andamento piuttosto simile.

Da entrambi i rendimenti quantici si vede come le alghe appartenenti all'ordine Prorocentrales (*P. minimum* e *P. micans*) esposte a concentrazioni di terbutilazina pari a 25 µg/l e 50 µg/l mostrino un'efficienza fotosintetica simile a quello delle colture senza erbicida (Fig. 7.1 e 7.2).

Un maggior effetto dell'erbicida si osserva in *Heterosigma hakashiwo* (Fig. 7.3.) con una minore resa fotosintetica esclusivamente se esposta a concentrazioni di 50 µg/l.

Per quanto riguarda *A. lusitanicum* e *S. trochoidea* invece si notano effetti evidenti anche quando vengono esposte alla concentrazione di 25 µg/L, in quanto le curve relative ai rendimenti quantici mostrano valori molto inferiori al controllo (Fig 7.4 e 7.5).

Dai grafici relativi alle alghe il cui rendimento quantico è riportato nelle figure 7.6, 7.7, 7.8, 7.9 si osserva una maggiore sensibilità dell'apparato fotosintetico ad entrambe le concentrazioni di erbicida rispetto a quelle riportate nei grafici 7.1, 7.2, 7.3, 7.4, 7.5. In particolare è interessante notare come *P. reticulatum*, *L. polyedrum* e *G. spinifera*, che mostrano uno stress simile, appartengano alla stessa famiglia delle Gonyaulacaceae.

I risultati precedenti sono riassunti nella figura 7.10. dove è riportata la percentuale di inibizione valutata in rapporto al rendimento quantico effettivo del controllo nel giorno in cui si aveva il valore massimo di efficienza fotosintetica. Tutte le microalghe testate in questo primo screening mostrano una inibizione della fotosintesi, più o meno marcata, alla concentrazione di terbutilazina di 50 µg/l (Fig. 7.10.). Infatti sette alghe su nove hanno una percentuale di inibizione superiore al 50%. Le uniche due alghe che mostrano un'inibizione della fotosintesi al di sotto della media sono *P. minimum* e *P. micans*, appartenenti entrambe all'ordine delle Prorocentrales. Quest'ordine addirittura rispetto alle altre alghe mostra di essere particolarmente resistente alla concentrazione di terbutilazina con valori di 17 e 41%, inoltre il rendimento quantico non è quasi influenzato dalla concentrazione di 25 µg/l, in quanto in *P. micans* è inibito del 18% mentre *P. minimum* è al 100% della sua efficienza fotosintetica.

Per quanto riguarda le specie più sensibili si nota invece come l'apparato fotosintetico di *F. japonica*, *L. polyedrum* e *G. spinifera* sia particolarmente stressato sia alla concentrazione di 50µg/l che al quella di 25 µg/l, con una inibizione superiore al 75% per entrambe le concentrazioni di erbicida per tutte e tre le microalghe.

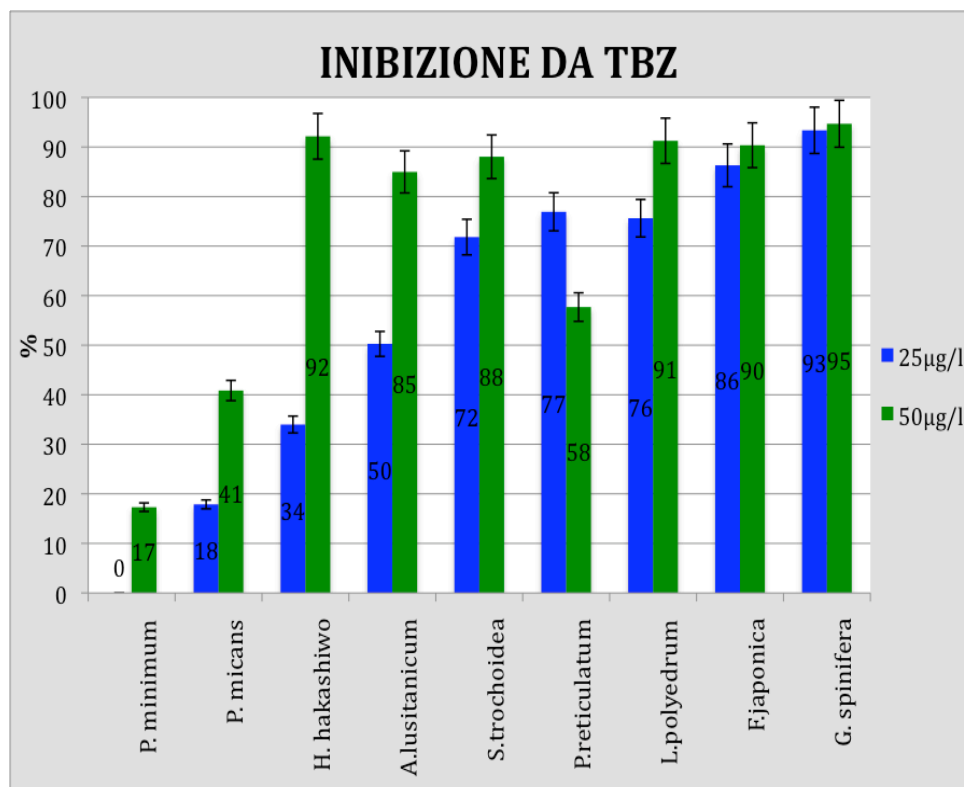


Figura 7.10. Inibizione da terbutilazina del rendimento quantico effettivo, in %, in microalghe flagellate dell'Adriatico

In seguito ai risultati ottenuti si è pensato di effettuare un'indagine più accurata sulle alghe più sensibili, utilizzando concentrazioni più basse e più ravvicinate rispetto a quelle finora testate.

7.2. Effetto di basse concentrazioni di terbutilazina (0,5 µg/l, 1 µg/l, 5 µg/l, 10 µg/l, 15 µg/l) sull'efficienza fotosintetica di *F. japonica*, *L. polyedrum* e *G. spinifera*.

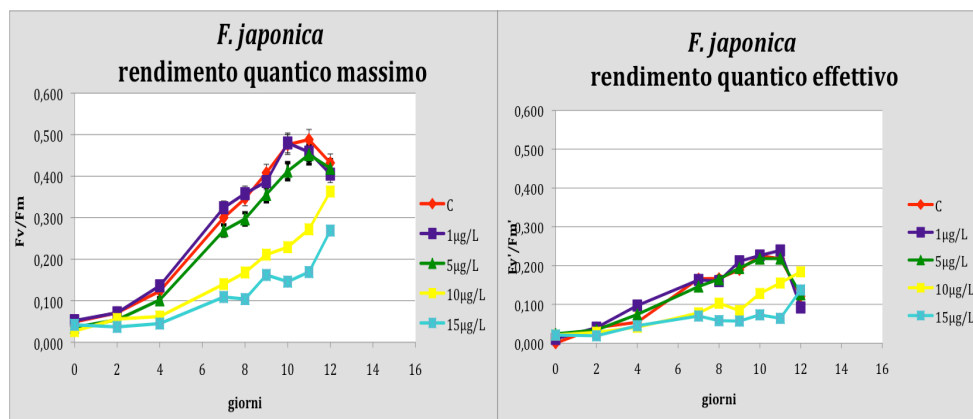


Figura 7.11. Effetto a basse concentrazioni di TBZ su *F. japonica*

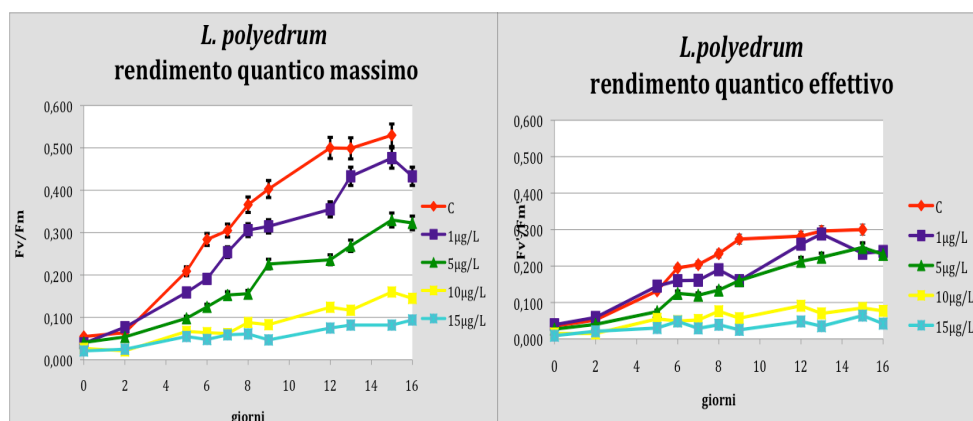


Figura 7.12. Effetto a basse concentrazioni di TBZ su *L. polyedrum*

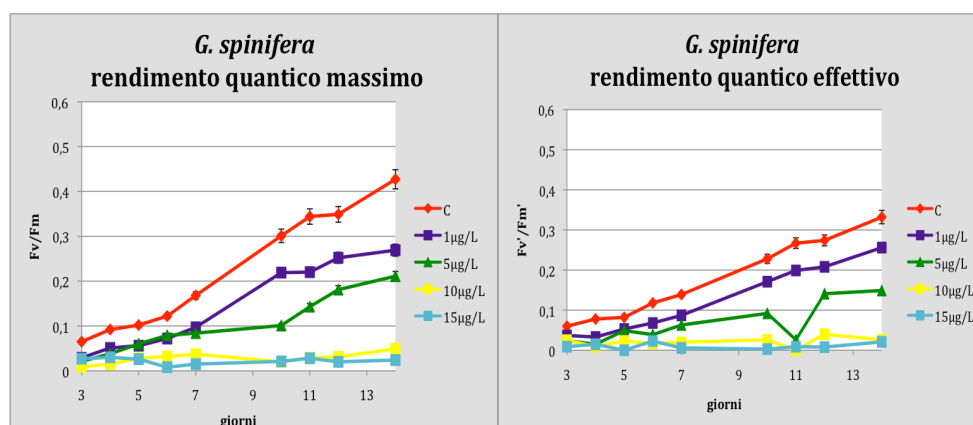


Figura 7.13. Effetto a basse concentrazioni di TBZ su *G. Spinifera*

In questa analisi sono state utilizzate concentrazioni di erbicida più vicine a quelle ambientali; dai risultati mostrati nelle figure si può notare come l'unica rafidoficea saggiata, non mostri particolari conseguenze in seguito all'esposizione alle più basse concentrazioni di terbutilazina, ma solo alle concentrazioni di 10 e 15 $\mu\text{g/l}$ (Fig 7.11.). Le due Gonyaulacaceae, al contrario, mostrano una maggiore sensibilità, sia nelle risposte dei rendimenti quantici massimi che di quelli effettivi, a tutte le concentrazioni di terbutilazina (Fig. 7.12. e 7.13.)

G. spinifera in particolare, alle concentrazioni di 10 μg e 15 μg ha un'efficienza fotosintetica massima ed effettiva vicino allo zero (Fig 7.13.)

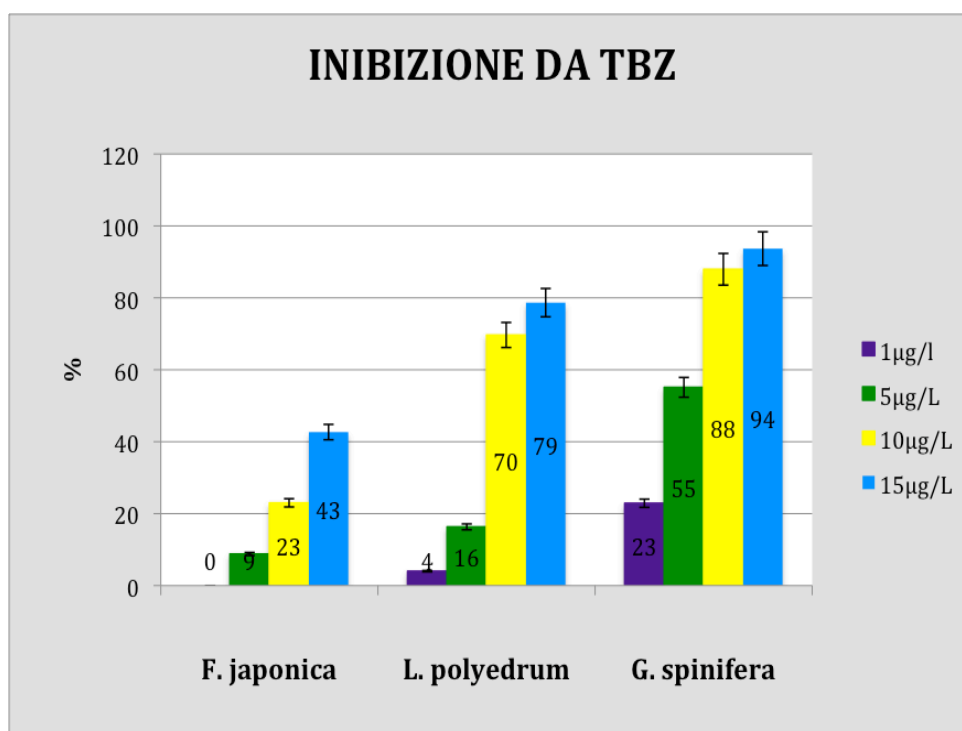


Figura 7.14. Inibizione del rendimento quantico effettivo, in %, da concentrazioni ambientali di terbutilazina

Inoltre come si può notare dal grafico in figura 7.14., *G. spinifera* esposta a 5 $\mu\text{g/l}$ TBZ e, soprattutto, a 1 $\mu\text{g/l}$, concentrazione rilevata anche in ambiente marino, è inibita in maniera marcata con valori, rispettivamente, del 55% e del 23 %.

7.3. Effetto del metanolo sull'attività fotosintetica

Per verificare che non fosse il metanolo utilizzato per sciogliere l'erbicida ad interferire con la fotosintesi, ma che l'inibizione osservata fosse esclusivamente conseguenza dell'esposizione a terbutilazina, le microalghe maggiormente sensibili all'erbicida sono state esposte anche a concentrazioni di metanolo corrispondenti a quelle aggiunte nelle colture insieme all'erbicida. Nessuna delle tre flagellate ha mostrato segni di inibizione, al contrario tutte e tre le microalghe hanno un'efficienza fotosintetica ottimale in presenza di tutte e tre le percentuali di metanolo saggate (0,001%, 0,002% e 0,003%).

Come si può osservare nelle figure 7.15., 7.16. e 7.17., dove sono mostrati i grafici dei rendimenti quantici massimi ed effettivi misurati, le curve relative alla presenza del metanolo non sono inferiori alle curve dei controlli, ad eccezione di *G. spinifera* con 0,003% di metanolo, percentuale a cui sono state sottoposte le microalghe solamente in occasione del primo screening con concentrazioni di erbicida a 50µg/l; con gli esperimenti non sono state superate soglie di metanolo superiori allo 0,0015%.

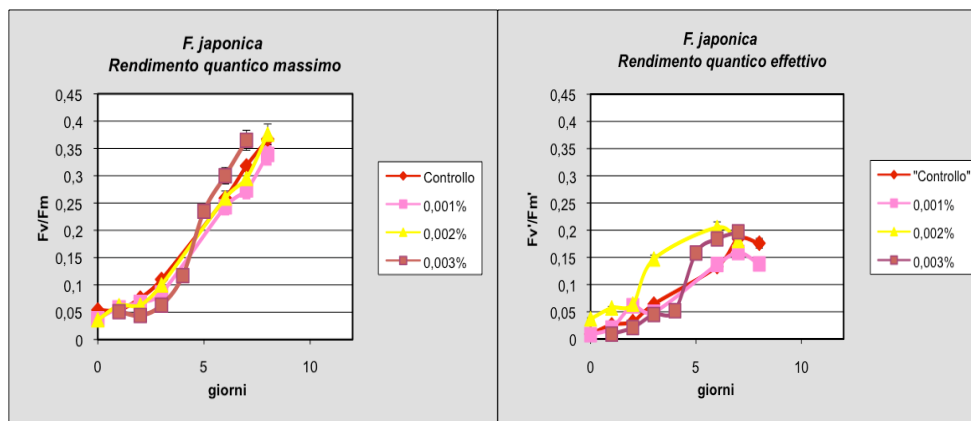


Figura 7.15. Effetto del metanolo sull'efficienza fotosintetica di *F. japonica*

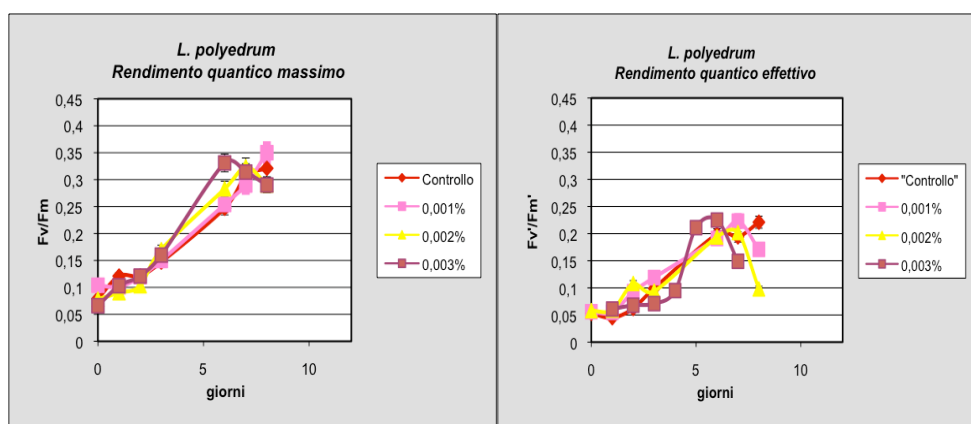


Figura 7.16. Effetto del metanolo sull'efficienza fotosintetica di *L. polyedrum*

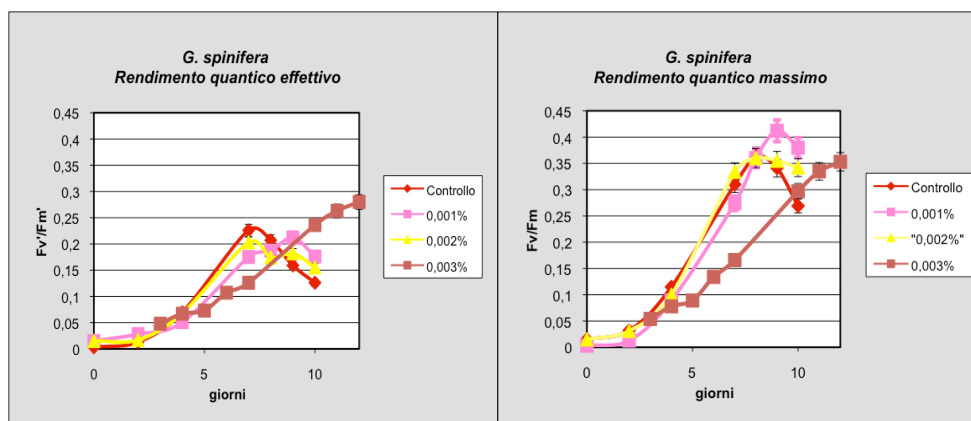


Figura 7.17. Effetto del metanolo sull'efficienza fotosintetica di *G. spinifera*

8. Risposte di *G. spinifera* e *P. minimum* alla presenza di terbutilazina a diverse temperature di crescita.

In seguito ai test precedenti si è deciso di utilizzare *G. spinifera* come alga da esporre a concentrazioni di terbutilazina pari a quelle ambientali ovvero 1 e 5 µg/L. Si è scelto di effettuare un esperimento anche con *P. minimum*, anche se esponendola a una concentrazioni elevata a causa della sua resistenza, per l'importanza di questa specie nel causare fioriture in diversi ambienti geografici. Inoltre visto che entrambe le microalghe fanno parte della comunità fitoplanctonica dell'Adriatico e visto che questo ambiente è caratterizzato da ampi range di temperatura dell'acqua, gli esperimenti sono stati eseguiti a due temperature differenti, per testare l'eventuale effetto sinergico della terbutilazina in concomitanza con i cambiamenti di temperatura dell'acqua.

8.1. Effetto della terbutilazina sui parametri fisiologici di *G. spinifera*

8.1.1. Crescita

Nelle figure 8.1. e 8.2. è mostrata la crescita di *G. spinifera* esposta a concentrazioni di 1 e 5 µg/L di terbutilazina a 20 e 25°C e misurata sia come torbidità che come numero di cellule. L'andamento è risultato simile mostrando la possibilità di usare il metodo della torbidità per valutare la crescita di questa microalga. I risultati mostrano valori simili di crescita come numero di cellule massimo ottenuto ad entrambe le temperature, anche se vengono raggiunti in tempi diversi. E' evidente infatti come la coltura a 20°C impieghi più tempo della coltura a 25°C per raggiungere gli stessi valori.

Alle temperature di 20°C e 25°C la curva di crescita relativa a *G. spinifera* con una concentrazione di 1 µg/l di terbutilazina, assume un andamento molto simile alla curva della coltura di controllo, con un minor numero di cellule nell'alga esposta a 1 µg/l TBZ a 20°C rispetto al controllo. Per la curva relativa alla concentrazione di 5 µg/l, in entrambe le temperature si ha un numero di cellule su millilitro molto inferiore rispetto al controllo, anche se alla fine della fase esponenziale nell'esperimento a 25°C l'alga con 5 µg/l di terbutilazina raggiunge lo stesso numero di cellule del controllo e di quella con 1 µg/l.

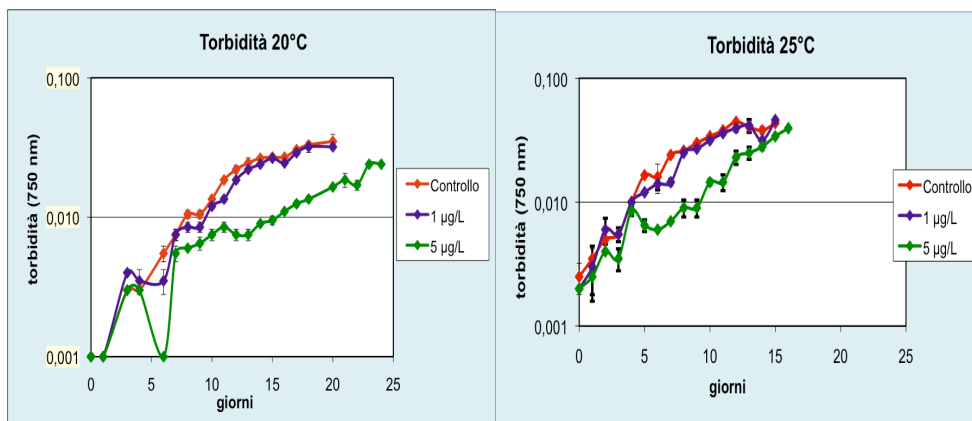


Figura 8.1. Curve di crescita basate sulla torbidità di *G. spinifera* alla temperatura di 20 e 25°C

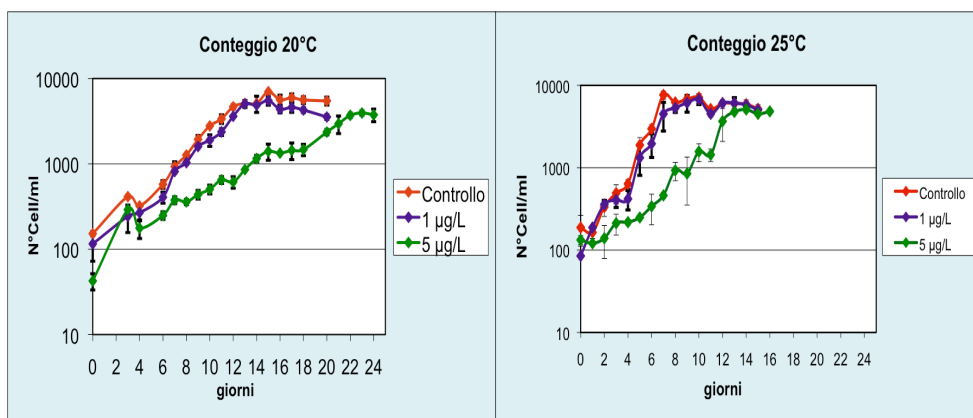


Figura 8.2. Curve di crescita basate sul conteggio di *G. spinifera* a 20°C e 25°C

Tabella 8.1. Numero massimo di cell/ml e tasso di crescita di *G. spinifera* in relazione alla temperatura e alla concentrazione di terbutilazina

temperatura	campione	N. massimo di cellule / ml	tasso di crescita d ⁻¹
20 °C	Controllo	6993	0,37
	1 µg/l	5512	0,28
	5 µg/l	3946	0,19
25 °C	Controllo	7660	0,83
	1 µg/l	6756	0,79
	5 µg/l	5099	0,40

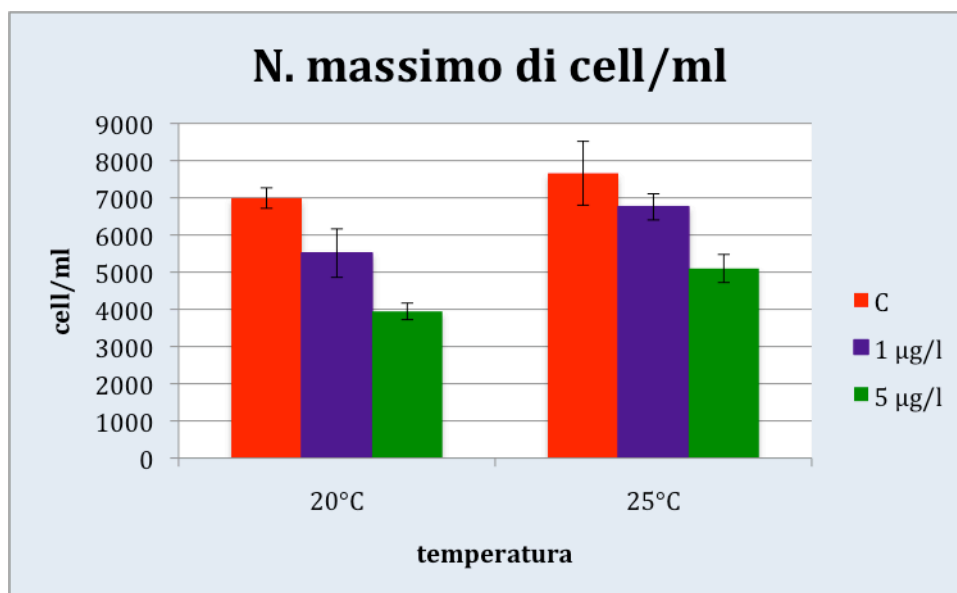


Figura 8.3. Numero massimo di cellule raggiunto nelle diverse colture a 20°C e a 25°C

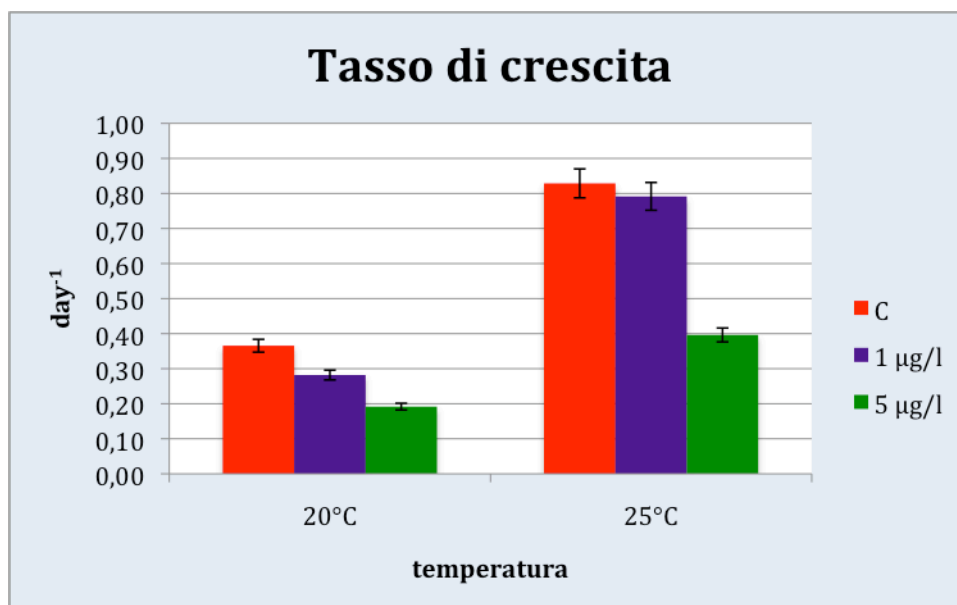


Figura 8.4. Tasso di crescita di G.spinifera a 20°C e a 25°C

Come si può notare in figura 8.3., ad entrambe le temperature *G. spinifera* raggiunge all'incirca gli stessi numeri massimi di cellule per millilitro. In particolare sia a 20°C che a 25°C, il controllo arriva a valori compresi tra 7000 e 7600 cell/ml, le colture esposte a concentrazioni di erbicida di 1 µg/l TBZ arrivano a 5500-6700 cell/ml, mentre con 5 µg/l si ottengono valori fra le 5000 e le 5500 cell/ml (tab. 8.1.). Dal grafico relativo al numero massimo di cellule su millilitro non risulta quindi evidente una grossa differenza fra le colture a 20°C e a 25°C, dato che invece emerge dal grafico in figura 8.4., relativo al tasso di crescita. Considerando questo valore si nota come la velocità di crescita di *G. spinifera* risenta meno dell'erbicida alla temperatura di 25°C, sia se esposta ad 1 µg/l, dove il tasso di crescita è leggermente inferiore a quello del controllo, sia con 5µg/l. Mentre risulta più rallentata la crescita a 20 °C sia nell'alga esposta all'erbicida, sia nell'alga controllo. Dal grafico in figura 8.4. si potrebbe quindi riassumere che il tasso crescita di *G. spinifera* aumenta con l'aumentare della temperatura e l'influenza da parte dell'erbicida viene accentuata dalla diminuzione della temperatura.

8.1.2. Efficienza fotosintetica

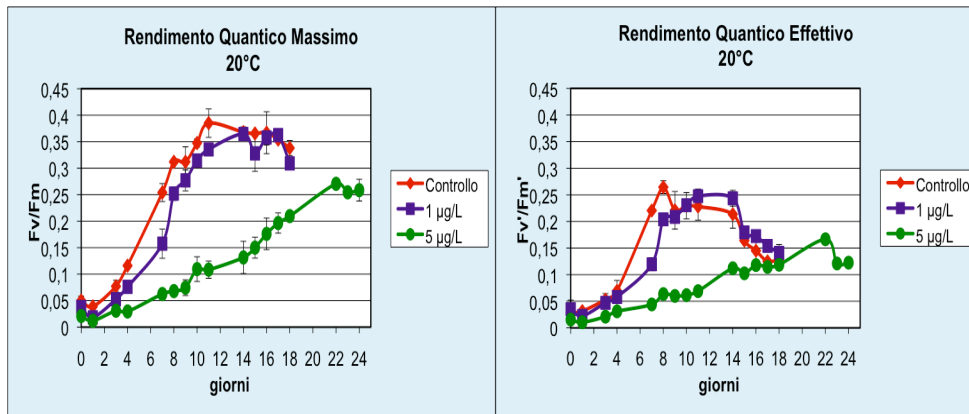


Figura 8.5. Rendimento quantico di *G. spinifera* a 20°C

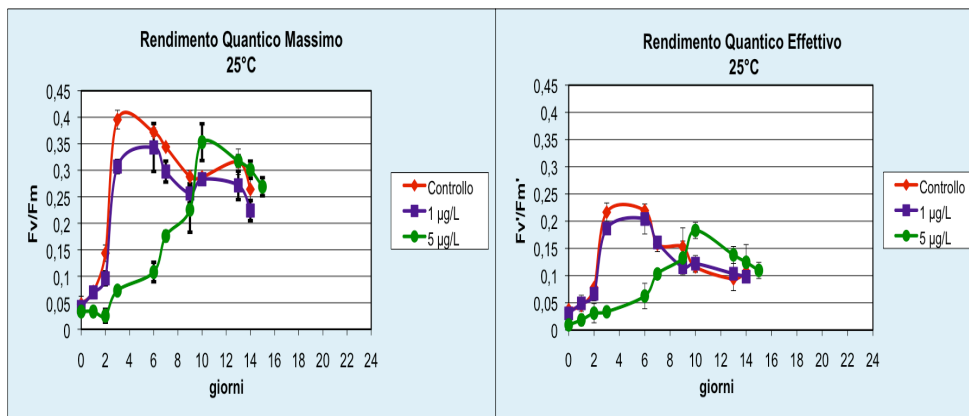


Figura 8.6. Rendimento quantico di *G. spinifera* a 25°C

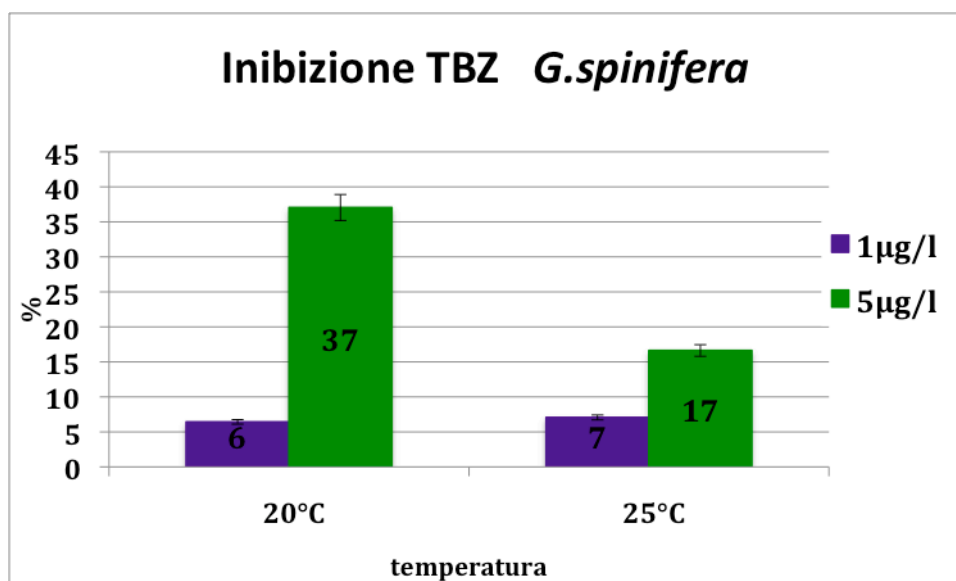


Figura 8.7. Percentuale di inibizione del rendimento quantico effettivo da terbutilazina su *G. spinifera* misurato a 20°C e a 25°C rispetto al controllo nei giorni di massima efficienza

Risposte simili a quelle osservate sulla crescita si possono notare anche a livello dell'efficienza fotosintetica, infatti le curve del rendimento quantico massimo ed effettivo nei grafici delle figure 8.5. e 8.6. mostrano chiaramente una maggior efficienza nell'alga priva di terbutilazina e valori simili si hanno anche nelle colture con la concentrazione più bassa.

In particolare a 20°C (fig. 8.5.), temperatura a cui corrisponde un tasso di crescita più basso, *G. spinifera* con 1 µg/L TBZ, ha un rendimento quantico massimo ed effettivo di poco inferiore rispetto al controllo; anche al raggiungimento della fase stazionaria i valori del controllo e di 1 µg/L si sovrappongono. Con 5 µg/L TBZ si nota un effetto maggiore dell'erbicida in quanto i valori di rendimento quantico non raggiungono mai i valori del controllo.

A 25°C invece l'effetto della terbutilazina sull'apparato fotosintetico è molto meno evidente, e anche se l'andamento delle curve del rendimento quantico sono simili a quelle a 20°C, la distanza fra i valori è minore.

Se prendiamo in considerazione i valori di inibizione (fig. 8.7.) possiamo quindi osservare come l'erbicida abbia un effetto di inibizione, sull'efficienza fotosintetica, piuttosto alto nell'alga esposta a 5 µg/l di terbutilazina, a 20°C e a 25°C rispettivamente del 37% e del 17%. L'erbicida aggiunto a concentrazioni di 1µg/l invece ha solo un lieve effetto, del 7% e 6%, ad entrambe le temperature.

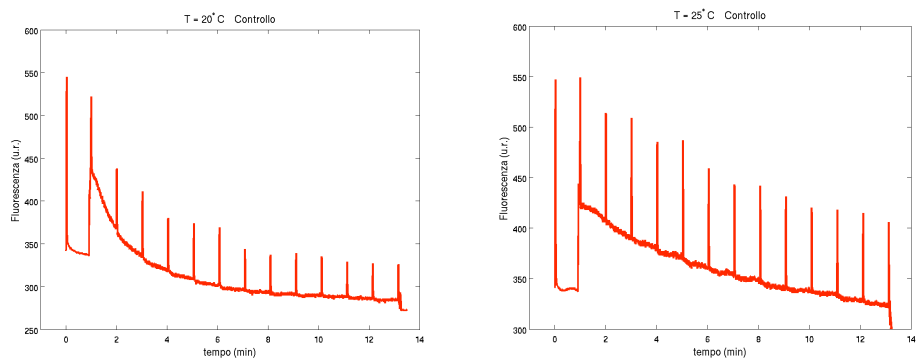


Figura 8.8. Curve di induzione di *G. spinifera* in assenza di terbutilazina a 20°C e a 25°C

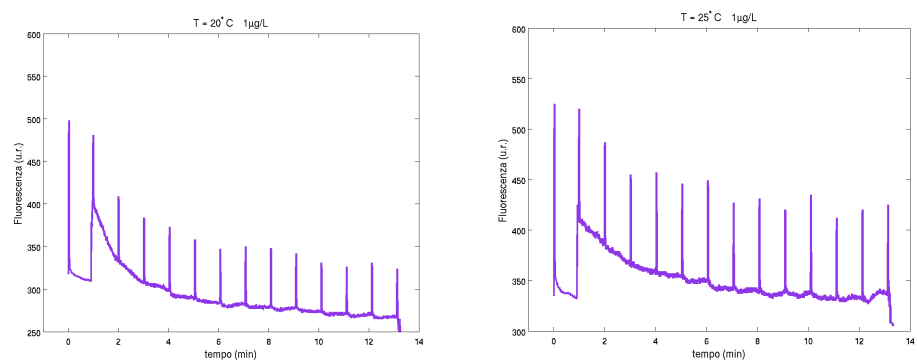


Figura 8.9. Curve di induzione di *G. spinifera* esposta a 1µg/l di terbutilazina a 20°C e a 25°C

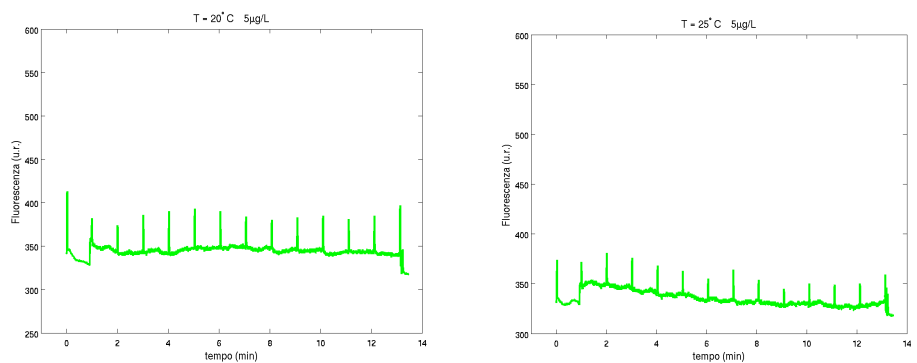


Figura 8.10. Curve di induzione di *G. spinifera* esposta a 5 µg/l di terbutilazina a 20°C e a 25°C

L'esecuzione delle curve di induzione, mostrate in fig. 8.8., 8.9., 8.10., permette di ottenere una misura più precisa del rendimento quantico effettivo. In questo caso le curve ottenute danno un'ulteriore conferma dell'effetto di diminuzione dell'efficienza della fotosintesi all'aumentare della concentrazione di terbutilazina. Risulta inoltre evidente come alla temperatura più bassa, cioè a 20°C, l'effetto dell'erbicida sia più marcato, con una minore resa dell'apparato fotosintetico, come già visto in precedenza; è particolarmente visibile l'effetto della terbutilazina nei grafici di *G. spinifera* esposta alla concentrazione di 5µg/l, dove i picchi delle curve che rappresentano la fluorescenza relativa sono molto più bassi rispetto a quelli ottenuti per il controllo e per la coltura esposta alla concentrazione di 1µg/l.

8.1.3. Contenuto cellulare: clorofilla a.

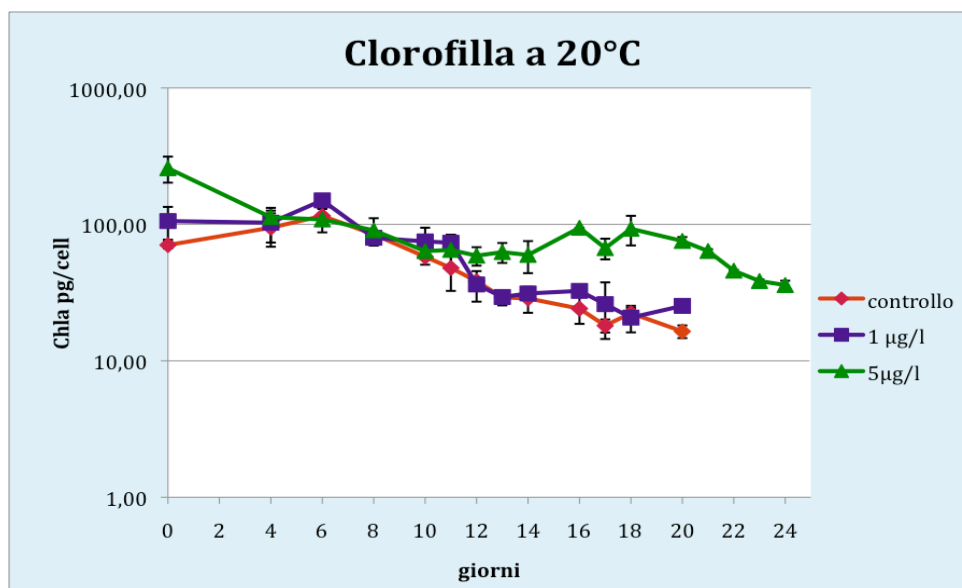


Figura 8.11. Contenuto cellulare di clorofilla a in *G. spinifera* a 25°C

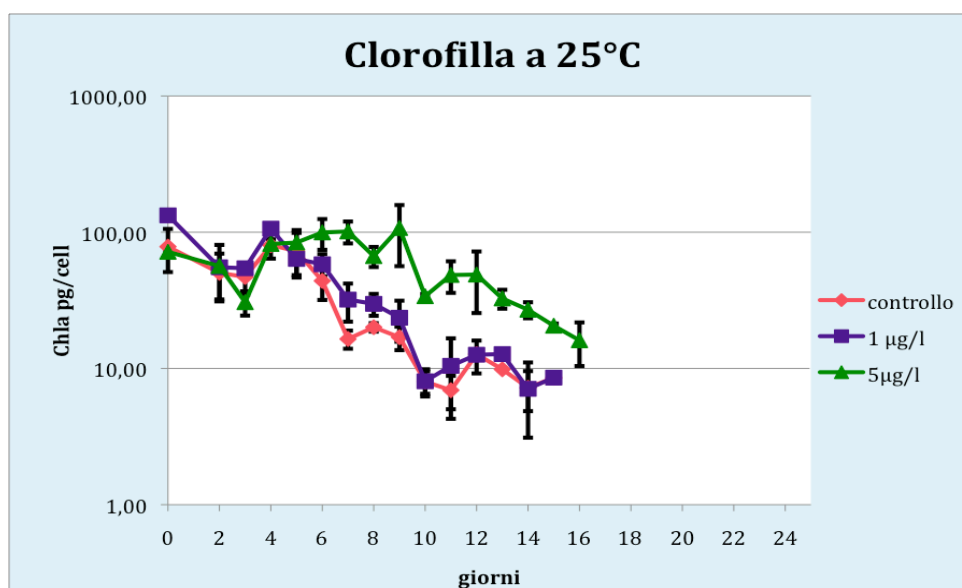


Figura 8.12. Contenuto cellulare di clorofilla a in *G. spinifera* a 20°C e a 25°C

Per quanto riguarda le curve relative ai contenuti cellulari di clorofilla a (fig. 8.11. e 8.12.), ottenuti da prelievi giornalieri ed espressi per cellula, possiamo notare un andamento opposto rispetto alle curve di crescita e ai grafici dei rendimenti quantici visti in precedenza.

In generale si hanno valori maggiori di clorofilla durante la fase esponenziale di crescita, mentre durante la fase stazionaria, la concentrazione di clorofilla a inizia a diminuire, probabilmente a causa dell'esaurimento dell'azoto aggiunto nel terreno di coltura. Nei primi giorni le curve presentano valori simili per tutte e tre le colture mentre, a partire dal giorno 8-10 per l'esperimento a 20°C e dal giorno 4 per quello a 25°C, i valori di clorofilla per *G. spinifera* esposta a 5 µg/l TBZ, sono chiaramente superiori a quelli della coltura controllo e di quella con 1 µg/l TBZ.

Soprattutto a 20°C dove la crescita della coltura con 5µg/l di terbutilazina mostra un rallentamento, con un tasso di crescita di 0,19 d⁻¹, il contenuto del pigmento resta ad alti livelli per più giorni rispetto al controllo e alla coltura con concentrazione di 1µg/l; i valori sono superiori rispetto alle colture a 25°C dove i tassi di crescita sono maggiori e di conseguenza il contenuto di clorofilla diminuisce già dal giorno 9.

E' interessante notare come la clorofilla aumenti nelle colture con maggiori concentrazioni di terbutilazina e che quindi hanno una maggiore inibizione del fotosistema II.

8.1.4. Variabili extracellulari

Sul terreno ottenuto filtrando i campioni prelevati quotidianamente dalle colture di *G. spinifera* a 20°C e a 25°C sono stati fatte delle analisi per valutare il contenuto di polisaccaridi secreti e il consumo dei nutrienti nel corso della crescita e valutare l'effetto della TBZ su queste variabili.

8.1.4.1. Polisaccaridi

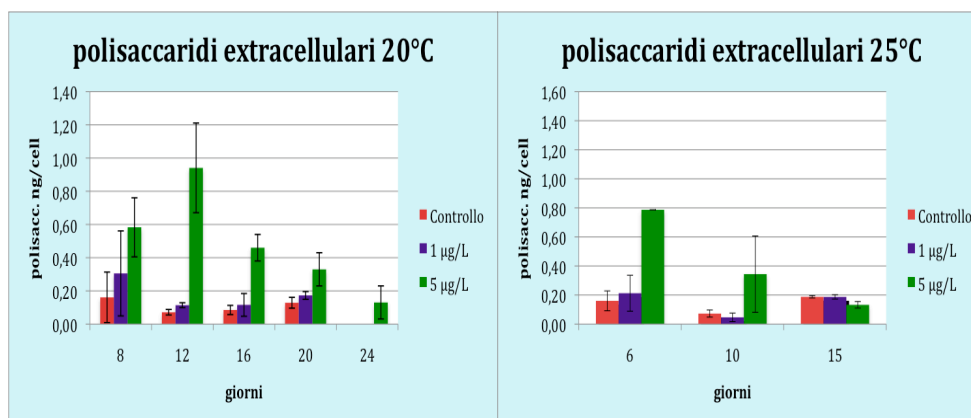


Figura 8.13. Polisaccaridi extracellulari presenti nel mezzo delle colture a 20°C e a 25°C

In generale si osserva un maggior rilascio di polisaccaridi da parte delle colture cresciute in presenza di terbutilazina. In particolare la curva relativa alla secrezione, espressa come ng/cellula mostra un andamento decrescente nel corso della crescita, con un maggior rilascio di materiale durante la fase esponenziale di crescita e un calo durante la fase stazionaria (fig 8.13.).

Una maggiore secrezione si nota soprattutto nella coltura a 20°C di *G. spinifera* esposta a concentrazioni di 5 µg/l TBZ, , anche se nel caso dei polisaccaridi sono più evidenti le differenze dovute alla presenza dell'erbicida che quelle dovute ad un effetto della temperatura.

8.1.4.2. Nitrati e fosfati

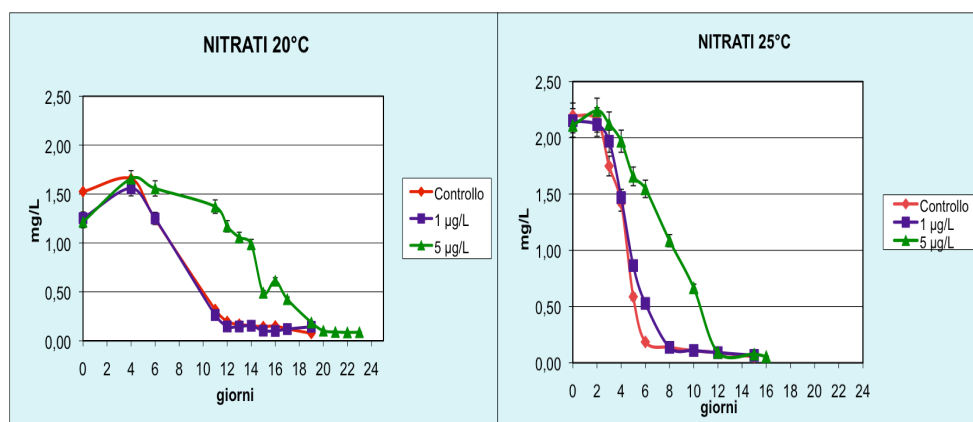


Figura 8.14. Consumo dei nitrati nelle colture di *G. spinifera* a 20°C e a 25°C

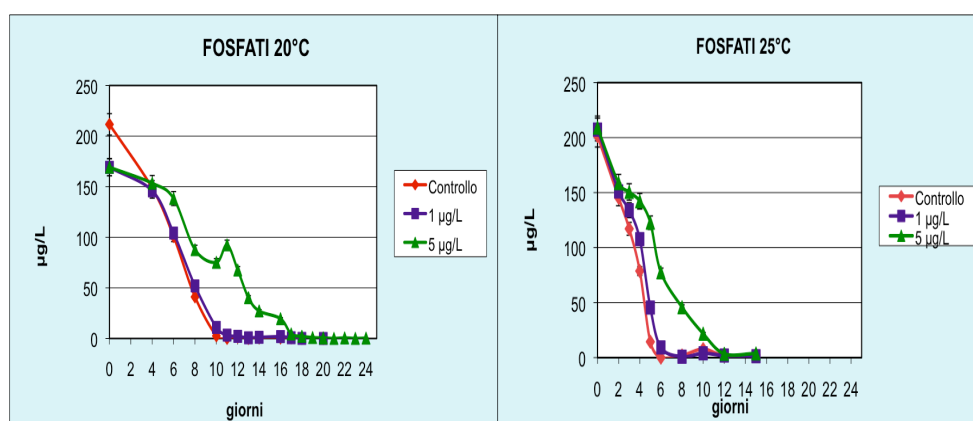


Figura 8.15. Consumo dei fosfati nelle colture di *G. spinifera* a 20°C e a 25°C

Per quanto riguarda il consumo dei nutrienti risulta evidente dai grafici nelle figure 8.14. e 8.15 un più rapido consumo per le colture cresciute alla temperatura di 25°C. Inoltre si nota un maggior consumo sia di nitrati che di fosfati nelle colture di controllo e quelle con 1µg/l di terbutilazina, mentre vengono consumati più lentamente, con una pendenza di curva meno ripida, dalle colture a 5µg/l.

I fosfati (fig. 8.15) arrivano a zero dopo pochi giorni di coltura, ovvero dopo 10 giorni a 20°C e dopo 6 giorni a 25°C, con un consumo maggiore in relazione alla fase esponenziale di crescita. Una volta terminati i fosfati, *G. spinifera* smette di crescere e di conseguenza non consuma più neanche i nitrati (fig 8.14) che quindi non raggiungono lo zero, pur rimanendo in quantità di pochi mg/L.

8.2. Effetto della terbutilazina sui parametri fisiologici di *P. minimum*

8.2.1. Crescita

Per quanto riguarda le curve di crescita ottenute misurando la torbidità si nota un andamento comune per le colture di *P. minimum* ad entrambe le temperature (fig. 8.16), e gli stessi andamenti, si notano nelle curve ottenute grazie al conteggio delle cellule (fig. 8.17) ma con un raggiungimento della fase stazionaria più rapida nel metodo del conteggio rispetto a quello basato sulla torbidità.

Inoltre è osservabile come le colture di *P. minimum* poste alla temperatura di 20°C impiegano più tempo a crescere rispetto a quelle a 25°C mostrando una fase esponenziale più lunga.

Come già visto dagli esperimenti preliminari, effettuati valutando l'efficienza fotosintetica, *P. minimum* non dimostra una particolare sensibilità alla presenza di erbicidi a basse concentrazioni, ma inizia ad essere leggermente influenzato, per quanto riguarda la crescita, da concentrazioni di erbicida di 30µg/l, molto più alte di quelle trovate in ambiente marino. *P. minimum* esposto a 30µg/l TBZ infatti ha una curva di crescita leggermente diversa dal controllo con valori leggermente inferiori per entrambi i metodi ad entrambe le temperature.

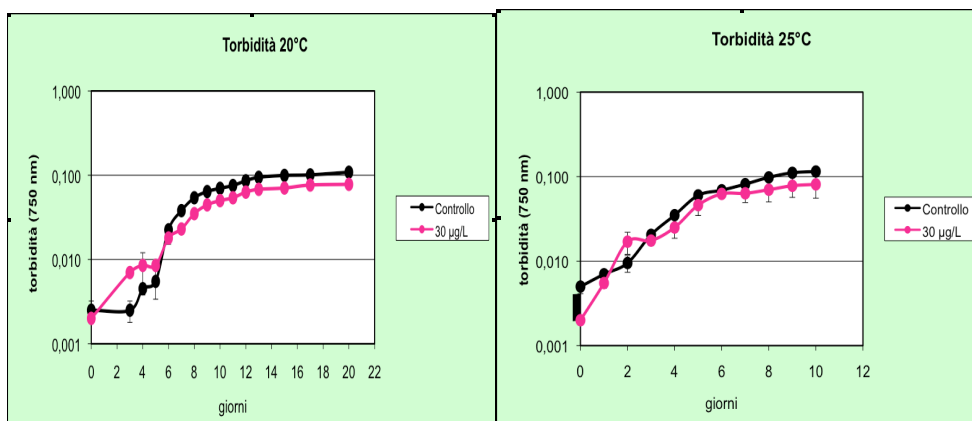


Figura 8.16 Curve di crescita basate sulla torbidità di *P. minimum* alla temperatura di 20 e 25°C

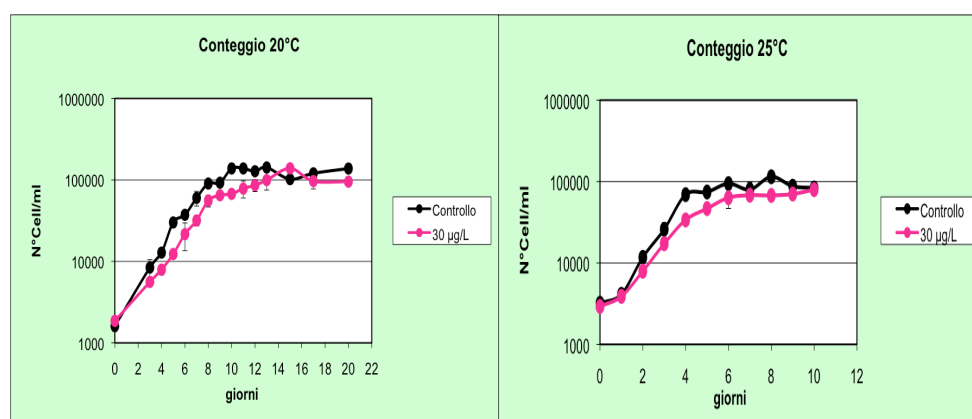


Figura 8.17 Curve di crescita basate sul conteggio di *P. minimum* a 20°C e 25°C

Tabella 8.3 Numero massimo di cell/ml e tasso di crescita di *P. minimum* in relazione alla temperatura e alla concentrazione di terbutilazina.

temperatura	campione	valore massimo di n di cellule / ml	tasso di crescita d ⁻¹
20°C	Controllo	138299	0,497
	30µg/l	138688	0,450
25°C	Controllo	114602	0,886
	30µg/l	79639	0,607

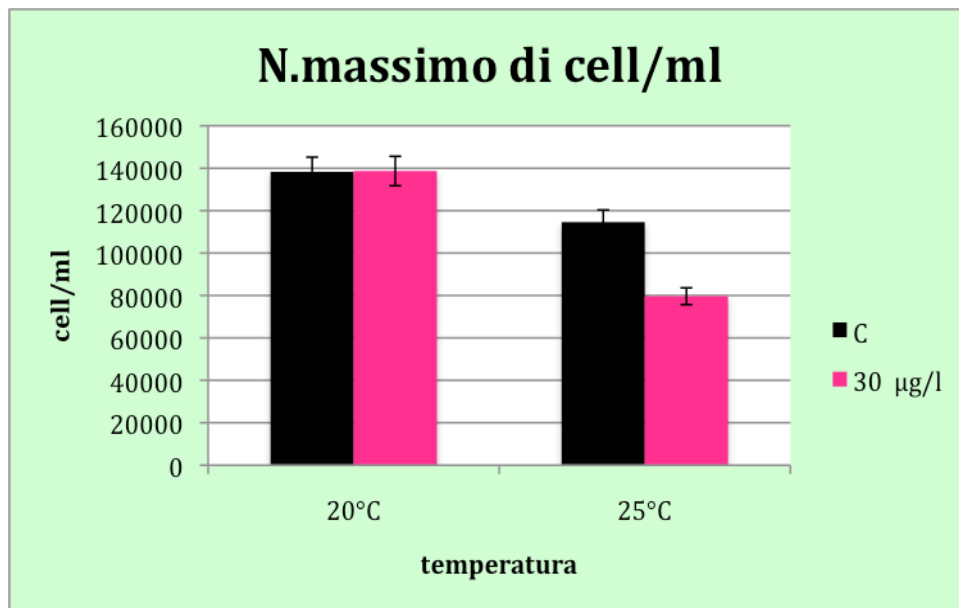
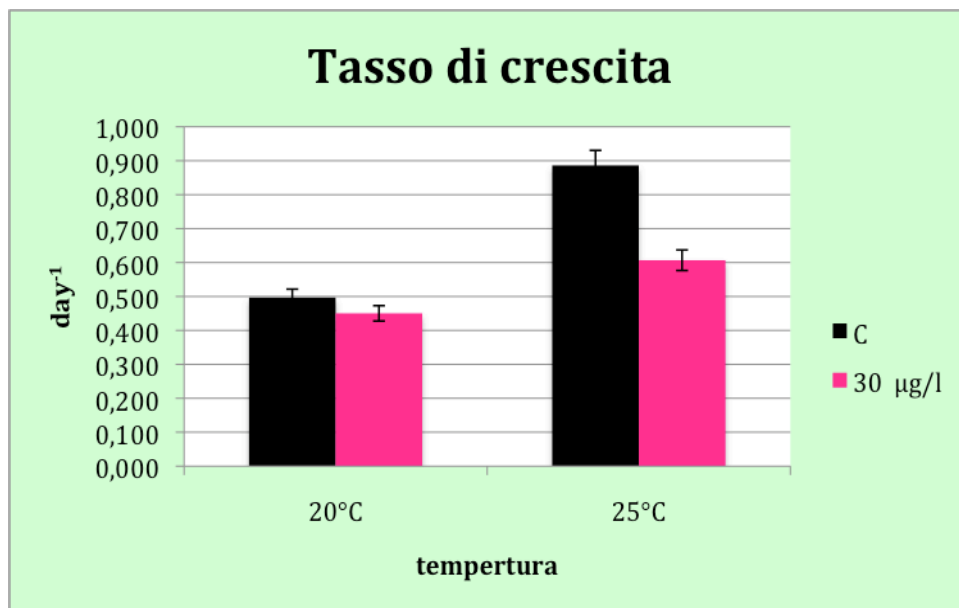


Figura 8.18. Numero massimo di cellule raggiunto nelle diverse colture a 20°C e a 25°C



*Figura 8.19. Tasso di crescita di *P. minimum* a 20°C e a 25°C*

Come si può notare in tabella 8.3. il massimo numero di cellule/ml raggiunto si ha nelle colture a 20°C sia per il controllo che per quelle con 30µg/l TBZ. Mentre se prendiamo in considerazione il tasso di crescita si osserva che la velocità di crescita del controllo è il doppio rispetto al controllo a 20°C, cosa che giustifica il raggiungimento più rapido della fase stazionaria nelle colture a 25°C. dove. Anche in *P. minimum* esposto a 30 µg/l di erbicida si nota un raggiungimento di numero di cellule molto più alto a 20°C che a 25, ma con un tasso di crescita inferiore rispetto a quello di *P. minimum* cresciuto in presenza di terbutilazina a 25°C.

Queste caratteristiche sono ancora più evidenti se si osservano i grafici in figura 8.18. e 8.19., in cui si nota una maggior sensibilità di *P. minimum* alla terbutilazina se si considera il numero massimo di cellule raggiunto, e una maggior sensibilità alla temperatura, più che all'erbicida se si considerano i tassi di crescita della coltura di controllo e con erbicida a 25°C.

8.2.2. Efficienza fotosintetica

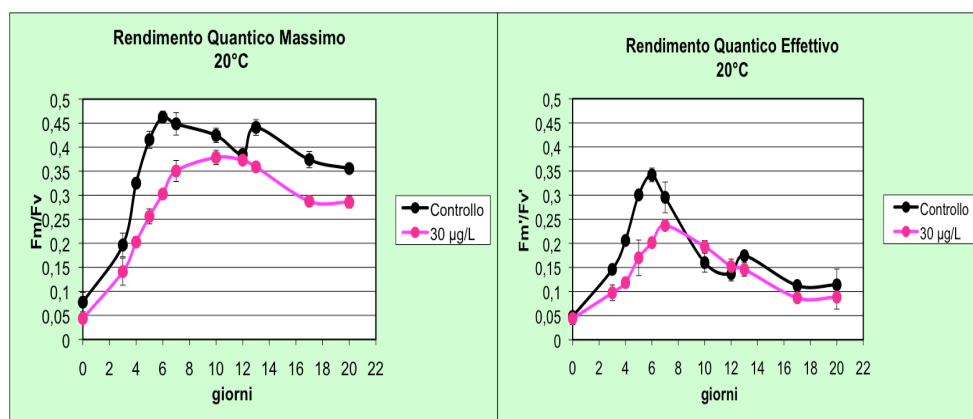


Figura 8.20. Rendimento quantico di *P. minimum* a 20°C

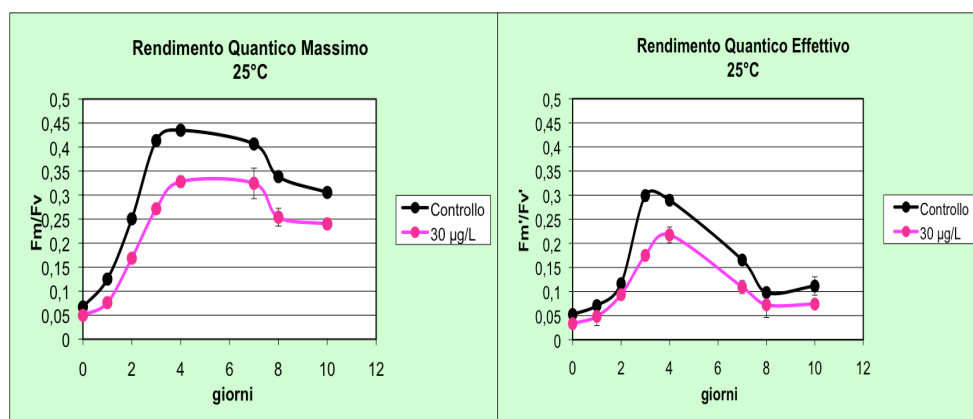


Figura 8.21. Rendimento quantico di *P. minimum* a 25°C

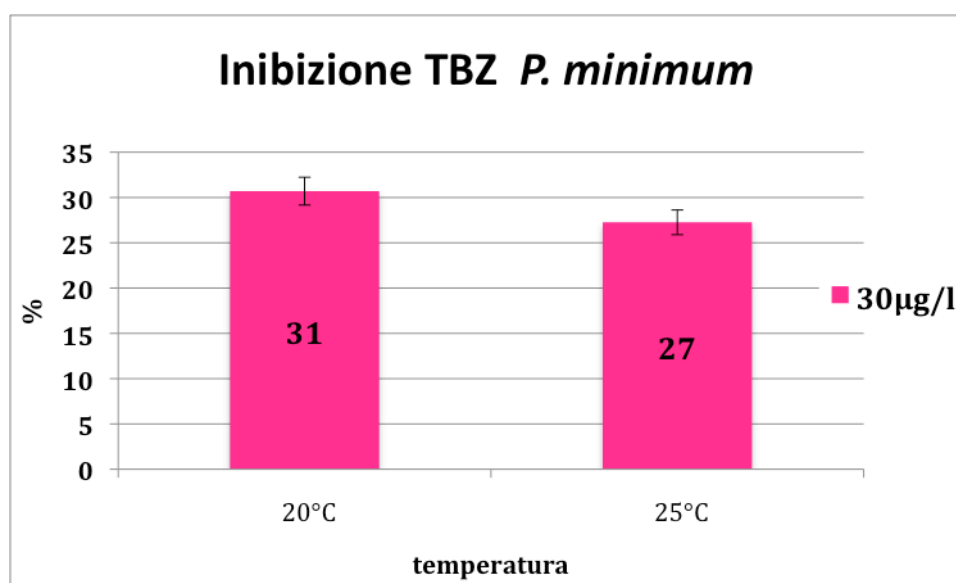


Figura 8.22. Percentuale di inibizione del rendimento quantico effettivo da terbutilazina su *P. minimum* misurato a 20°C e a 25°C rispetto al controllo nei giorni di massima efficienza

Se si prende in considerazione l'efficienza fotosintetica di *P.minimum* le differenze maggiori tra controllo e coltura esposta, si notano a livello dei rendimenti quantici effettivi, piuttosto che nei rendimenti quantici massimi in cui si hanno curve con andamenti simili (fig. 8.20. e 8.21.). Alla temperatura di 20°C le curve raggiungono valori più alti sia nella coltura di controllo sia in quella con l'erbicida, anche se impiegano il doppio del tempo, rispetto alle curve di *P.minimum* a 25°C, a raggiungere questi valori massimi. *P. minimum* in condizioni di controllo, a 20°C, impiega circa sei giorni per raggiungere lo yield massimo, e sette giorni in presenza di erbicida; a 25 °C la dinoflagellata impiega invece un tempo molto più breve per raggiungere la massima efficienza foto sintetica, 3 e 4 giorni rispettivamente senza e con erbicida.

Considerando l'efficienza fotosintetica ottimale pari al 100%, si nota che l'erbicida provoca un'inibizione della fotosintesi pari al 31% nell'alga a 20°C e 27% a 25°C (fig. 8.22.). Non si osserva quindi una grossa differenza nell'effetto dell'erbicida sull'apparato fotosintetico di *P. minimum* in funzione della temperatura di crescita, in quanto in entrambi i casi l'inibizione è molto simile.

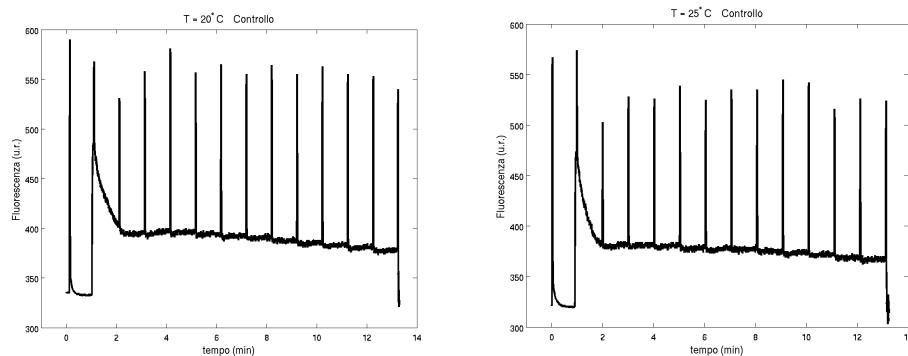


Figura 8.23. Curve di induzione di *P.minimum* senza terbutilazina a 20°C e a 25°C

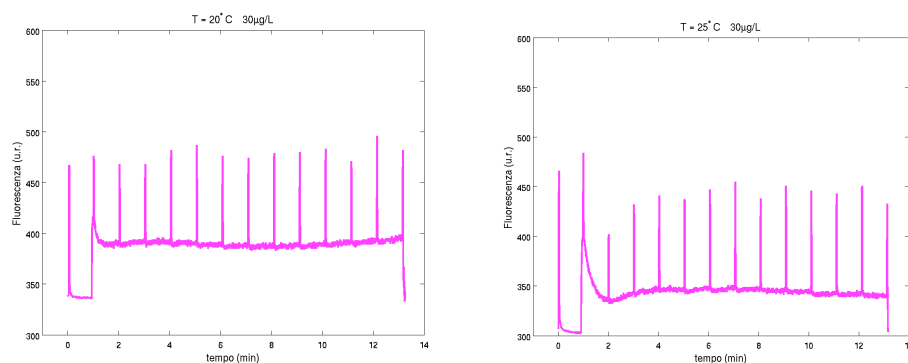


Figura 8.24. Curve di induzione di *P.minimum* con 30 µg/l di terbutilazina a 20°C e a 25°C

Con le curve di induzione rappresentate in figura 8.23. e 8.24., viene confermato l'effetto della terbutilazina a 30µg/l sull'apparato fotosintetico di *P. minimum* e la scarsa rilevanza della temperatura sull'effetto dell'erbicida. Ad entrambe le temperature è evidente come le curve della flagellata in assenza di terbutilazina raggiungano picchi più alti che in presenza di erbicida.

8.2.3. Contenuto cellulare: clorofilla a

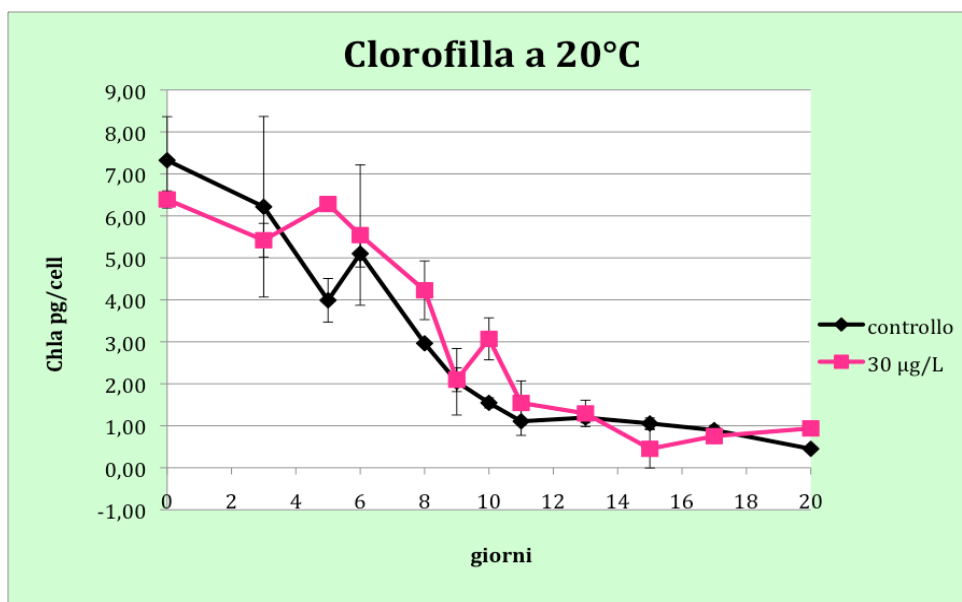


Figura 8.25. Contenuto cellulare di clorofilla a in P. minimum a 20°C

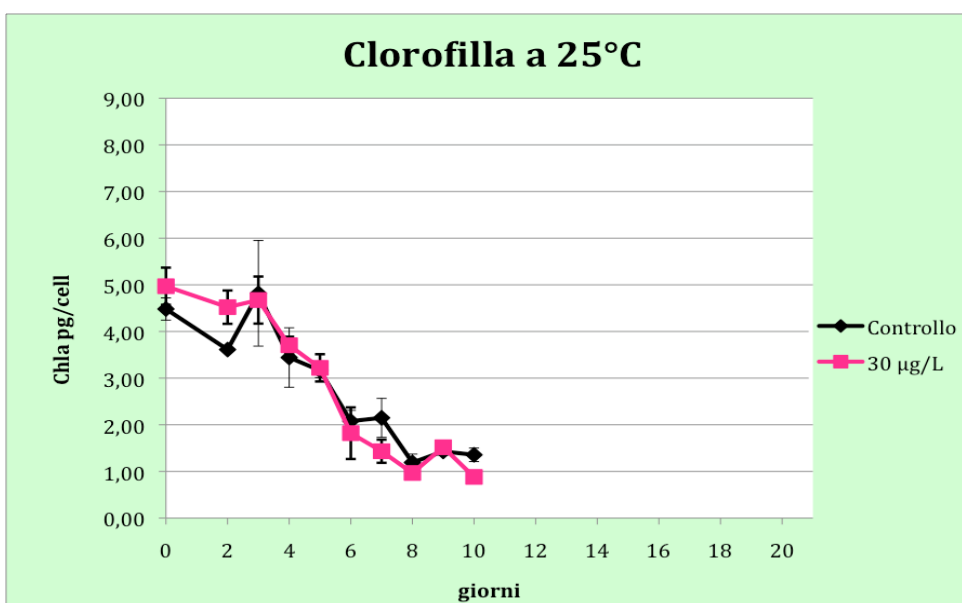


Figura 8.26. Contenuto cellulare di clorofilla a in P. minimum a 25°C

Analizzando il contenuto cellulare di clorofilla a si nota come nella coltura cresciuta a 25° C (fig. 8.26.), il pigmento sia presente in quantità inferiori rispetto a quella contenuta nelle alghe cresciute a 20°C (fig.8.25.).

Mentre alla temperatura di 25°C non si nota un effetto dell'erbicida, in quanto le curve relative al controllo e all'alga esposta a terbutilazina sono pressoché identiche, si possono osservare marcati effetti in *P. minimum* coltivato a 20°C. La clorofilla a contenuta nelle cellule cresciute in presenza dell'erbicida, mostra valori superiori rispetto alle cellule senza erbicida, anche se come già confermato dai valori di efficienza fotosintetica, l'inibizione da parte dell'erbicida non è particolarmente marcata; infatti la differenza fra il controllo e la coltura con 30 µg/l TBZ, in termini di clorofilla a, è di pochi picogrammi per cellula. Differenze maggiori erano state trovate nell'esperimento di *G. spinifera*.

8.2.4. Variabili extracellulari

8.1.4.1. Polisaccaridi

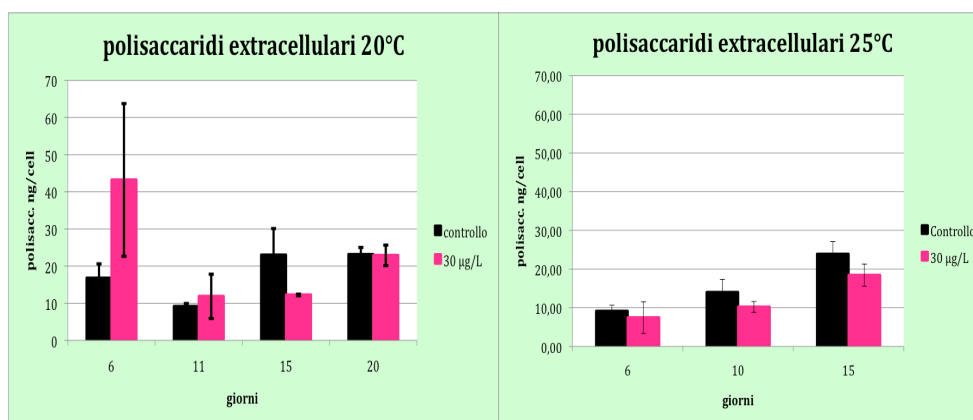


Figura 8.27 Polisaccaridi extracellulari presenti nel mezzo delle colture a 20°C e a 25°C

Dai grafici in figura 8.27. si possono notare le differenze nella secrezione di polisaccaridi da parte di *P. minimum* nelle diverse condizioni di crescita. In generale *P. minimum* secerne più polisaccaridi alla temperatura di 20°C, in cui abbiamo visto anche un maggior stress dell'apparato fotosintetico e, soprattutto in presenza dell'erbicida, l'escrezione di materiale polisaccaridico aumenta nei primi giorni.

A 25 °C, temperatura in cui *P. minimum* dimostra avere un tasso di crescita alto e una minor sofferenza fotosintetica, secerne più polisaccaridi nelle beute di controllo piuttosto che in quelle in cui è presente anche l'erbicida. Inoltre a questa temperatura è visibile un chiaro aumento della presenza di polisaccaridi extracellulari in relazione al raggiungimento della fase stazionaria e all'arresto della crescita.

8.2.4.2. Nitrati e fosfati

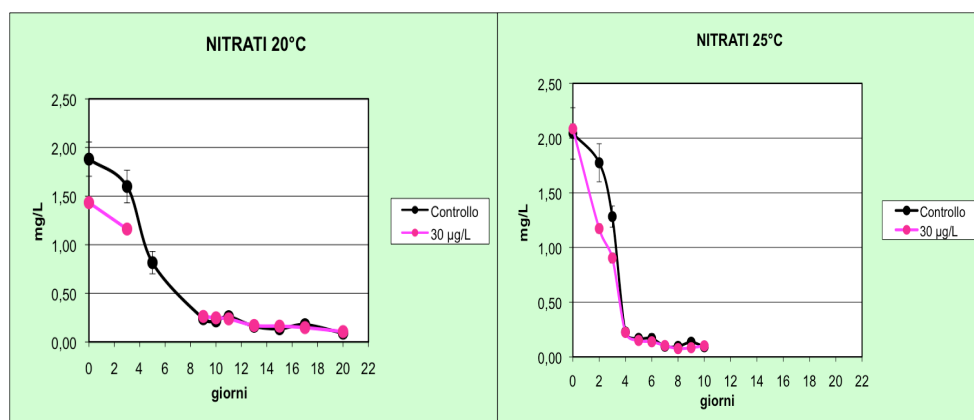


Figura 8.28. Consumo dei nitrati da P. minimum a 20°C e a 25°C

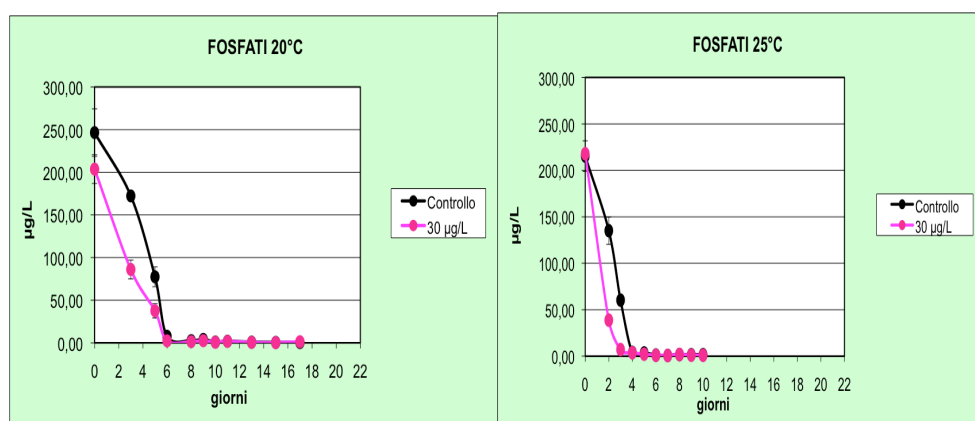


Figura 8.29. Consumo dei fosfati da P. minimum a 20°C e a 25°C

Come si nota dai grafici in figura 8.28. e 8.29. il consumo dei nutrienti presenti nel mezzo di coltura, è fortemente correlato alle curve di crescita dell'alga. Il consumo maggiore infatti si ha in corrispondenza della fase esponenziale di crescita, inoltre i nutrienti a 25°C vengono consumati prima in relazione al maggior tasso di crescita di *P. minimum* a questa temperatura.

Il consumo dei fosfati (fig. 8.29) avviene più velocemente e una volta azzerati, *P. minimum* smette di crescere e non consuma più neanche i nitrati (fig. 8.28.), i quali non vengono esauriti totalmente.

E' interessante notare come sia a 20°C che a 25°C il consumo dei fosfati avvenga più rapidamente nelle colture cresciute con l'erbicida piuttosto che nel controllo, ad entrambe le temperature.

DISCUSSIONE

Uno screening preliminare effettuato esponendo a concentrazioni di terbutilazina relativamente elevate diverse microalghe flagellate, rappresentative della comunità fitoplanctonica dell'Adriatico settentrionale e appartenenti a diverse categorie sistematiche, ha mostrato come la sensibilità a questo erbicida, comunemente rilevato nelle nostre acque, sia differenziata anche all'interno della stessa classe. Tra le dinoflagellate (classe Dinophyceae) una maggiore sensibilità si è osservata nelle specie appartenenti agli ordini Gonyaulales e Peridinales comprendente specie che provocano fioriture sia dannose che innocue. Altre dinoflagellate, quali due specie comuni appartenenti alle Prorocentrales, ordine che produce abbondanti fioriture nel mar Adriatico nel mese di giugno (F. B. Aubry et al. 2004), non mostrano un particolare stress alla terbutilazina se non ad alte concentrazioni. In particolare si è visto come *Gonyaulax spinifera* sia la microalga più sensibile alle concentrazioni di terbutilazina comunemente rilevate in mare, mentre *Prorocentrum minimum*, sia la flagellata meno stressata dall'erbicida; essendo questo un organismo molto comune in Adriatico è stato comunque oggetto di ulteriori accertamenti. Anche all'interno della classe Raphidophyceae si è vista una diversa sensibilità delle due specie *H. akashiwo* e *F. japonica*, entrambe dannose ma tra le quali solo la seconda produce fioriture estese in Adriatico.

Dai risultati degli esperimenti più dettagliati effettuati con *G. spinifera* e *P. minimum*, si è osservata una crescita più rapida da parte di entrambe le alghe alla temperatura maggiore a cui sono state fatte crescere (25°C), in quanto sia i tassi di crescita di *G. spinifera* che di *P. minimum*, sono più bassi a 20°C; tuttavia anche se cresce più lentamente, *P. minimum* raggiunge numeri maggiori di cellule alla temperatura di 20°C. L'effetto dell'erbicida sulla crescita di *G. spinifera* è stato lieve alla concentrazione di 1 µg/l e maggiore a livelli di 5 µg/l, sia a 20 che a 25°C. Per *P. minimum* invece l'effetto di inibizione è stato osservato solo a 25°C, temperatura in cui la crescita della microalga è risultata più rapida ma sfavorevole al raggiungimento di un numero di cellule più elevato che a 20°C.

Se si considera l'efficienza fotosintetica, c'è un forte riscontro con gli studi trovati in bibliografia che sottolineano un'azione dell'erbicida triazinico a livello dell'apparato fotosintetico, con inibizione del fotosistema II (U. Dorigo et al. 2004). Infatti dai dati relativi all'efficienza fotosintetica è stata osservata una inibizione da parte della terbutilazina su *G. spinifera* già alla concentrazione ambientale di 1 µg/l anche alla temperatura ottimale per l'alga (25°C). Anche *P. minimum* mostra un'inibizione della fotosintesi in presenza delle elevate concentrazioni di terbutilazina utilizzate per valutare un effetto sulla crescita; è da notare che non si osservano differenze sostanziali al variare della temperatura al contrario di quanto riportato per la crescita.

E' interessante osservare come i risultati inerenti al contenuto per cellula di clorofilla a mostrino un andamento a prima vista opposto al rendimento fotosintetico, infatti sia in *P. minimum* e ancora di più in *G. spinifera* le cellule in presenza dell'erbicida hanno un contenuto maggiore di clorofilla rispetto al controllo. Si può supporre che questo risultato sia da attribuire ad una risposta delle cellule basata sul tentativo di sopperire ad una minor efficienza dell'apparato fotosintetico con un aumento dei pigmenti che partecipano alla fotosintesi. In questo caso anche la misura della clorofilla fornisce un valido strumento per valutare lo stress fotosintetico delle microalghe.

Per quanto riguarda l'andamento dei nutrienti nel terreno di coltura si può notare un maggior assorbimento di fosfati e nitrati, da parte delle colture non stressate dall'aggiunta di terbutilazina, con un andamento parallelo alla crescita. Fa eccezione *P. minimum* che, come osservato anche nella diatomea *Skeletonema marinoi* in studi precedenti, consuma più fosfati in presenza dell'erbicida triazinico. Al momento non è chiaro quale possa essere il motivo fisiologico alla base di questo comportamento anche se si potrebbe pensare al tentativo di immagazzinare fosfati per sopperire alla minore energia prodotta, sotto forma di ATP, a causa dell'inibizione della fotosintesi.

Infine, per quanto riguarda i risultati relativi ai polisaccaridi, si è notata una maggiore secrezione da parte delle microalghe più stressate, in particolare di *G. spinifera* anche in presenza di basse concentrazioni di erbicida e di *P.*

minimum a 20°C. Si deve notare che le due alghe differiscono molto per il quantitativo di polisaccaridi rilasciati, in quanto nelle colture di *P. minimum* sono state misurate concentrazioni di circa 20 ng/cellula contro valori inferiori a 0,5 ng/cellula per lo più presenti nelle colture di *G. spinifera*. E' noto che queste sostanze possono conferire alle cellule protezione nei confronti di inquinanti presenti nel mezzo esterno, per cui non è da escludere che la maggiore resistenza di *P. minimum* all'erbicida possa essere dovuta alle maggiori quantità di polisaccaridi extracellulari.

In conclusione, da questi studi si è visto come l'erbicida terbutilazina, uno dei composti più abbondanti tra quelli riscontrati in acque superficiali e sotterranee dell'area padano-veneta, sia in grado di influenzare la crescita e la fotosintesi di microalghe flagellate dell'Adriatico, anche a concentrazioni pari a quelle rilevate in ambiente. Inoltre si è evidenziato che gli effetti sono maggiori alle temperature in cui le microalghe hanno una crescita meno efficiente. Questo comportamento era già stato osservato nella diatomea *S. marinoi* che cresce meglio a basse temperature (10-15°C) e per cui l'effetto dell'erbicida si è mostrato maggiore alle temperature più elevate.

Questi studi hanno mostrato l'utilità delle misure di fotosintesi tramite fluorimetro PAM nel valutare le risposte delle microalghe a questa categoria di inquinanti. E' stato messo in evidenza il diverso comportamento delle microalghe flagellate in presenza dell'erbicida terbutilazina, aspetto che potrebbe avere conseguenze rilevanti sulle fioriture estive di fitoplancton in caso di presenza in mare di concentrazioni non particolarmente elevate di erbicidi. Si deve considerare infatti che gli erbicidi presenti nell'ambiente non sono rappresentati da un solo composto e quindi potrebbero esserci anche interazioni sinergiche fra sostanze diverse. Infine i dati ottenuti, insieme a misure di carbonio cellulare non ancora effettuate, saranno utili per la messa a punto di modelli sul comportamento di diverse categorie fitoplanctoniche alla presenza di inquinanti in concomitanza con temperature diverse.

BIBLIOGRAFIA

APAT “ Rapporto nazionale residui di prodotti fitosanitari nelle acque”

Aubry F. B., Berton A., Bastianini M., Socal G., Acri F. (2004) “Phytoplankton succession in a coastal area of the NW Adriatic, over a 10-year sampling period (1990-1999)”. *Continental Shelf Research* 24: 97-115

Barreiro R, Pratt J.R. (1994) “Interaction of toxicants and communities: the role of nutrients.” *Envir. Toxicol. Chem.* 13: 361–368.

Bartoluzzi G., Frascari F., Frignani M., Giordani P., Guerzoni S., Rovatti G., Turci C. (1984). “Influenza del Po e dei fiumi minori sul contenuto di sostanze nutrienti nei sedimenti marini dell’Emilia Romagna”. *Memorie della Società Geologica Italiana* 27: 483-497.

Barsanti L. Coltelli P., Valtere E., Frassanito A. M., Passarelli V., Vesentini N., Gualtieri P. (2008) “The world of algae”. *Algal toxins: Nature Occurrence, Effect and Detection.* pp. 1-15

Boni L., Guerrini F., Pistocchi R., Cangini M., Pompei M., Cucchiari E., Romagnoli T., Totti C. (2005) “Microalghe tossiche del Medio ed Alto Adriatico”. Casa Editrice Fernandel, Ravenna, pp.64

Boni, L., Ceredi, A., Guerrini, F., Milandri, A., Pistocchi, R., Poletti, R., Pompei, M. (2000). “Toxic *Protoceratium reticulatum* (Peridiniales, Dinophyta) in the Northern Adriatic Sea (Italy)”. In: Hallegraeff, G.M., Blackburn, S.I., Bolch, C.J., Lewis, R. (Eds.), *Harmful Algal Blooms 2000*. UNESCO, Paris, pp. 137e140.

Boni L., Pompei M., Reti M. (1986) “Maree colorate e fioriture algali lungo le coste dell’Emilia-Romagna dal 1982 al 1985 con particolare riguardo alla comparsa di *Protogonyaulax tamarensis*”. *Nova Thalassia* 8: 237e245.

Carafa R., Wollgast J., Canuti E., Ligthart J., Dueri S., Hanke J., Eisenreich S.J., Viaroli P., Zaldivar J.M. (2007) "Seasonal variations of selected herbicides and related metabolites in water, sediment, seaweed and clams in the Sacca di Goro coastal lagoon (Northern Adriatic)". *Chemosphere* 69: 1625-1637

De Boer M. K., Tyl M. R., Vrieling E. G., van Rijssel M. (2004). Effects of salinity and nutrient conditions on growth and haemolytic activity of *Fibrocapsa japonica* (Raphidophyceae)" *Aquatic Microbial Ecology*; vol. 37: 171-181.

De Lorenzo M. E., Scott G. I., Ross P. E. (2001) "Toxicity of pesticides to aquatic microorganisms: review". *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 20, No. 1, pp. 84 –98

Dodge (1989) "Some revisions of the family Gonyaulaceae". *Botanica marina*-vol.32, Fasc.4 p. 277

Dorigo U., Bourrain X., Berard A., Leboulanger C. (2004) "Seasonal changes in the sensitivity of river microalgae to atrazine and isoproturon along a contamination gradient". *The science of the Total Environment* 318: 101-114

Fonda Umani S., Milani L., Borme D., de Olazabal A., Parlato S., Precali R., Kraus, D. Lucic R., Njire J., Totti C., Romagnoli T., Pompei M., Cangini M. (2005) "Inter-annual variations of planktonic food webs in the northern Adriatic Sea". *Science of the Total Environment* 353: 218-231

Ghirardelli E. (1981), *Il nostro universo, La vita nelle acque*, Utet.

Giardi M. T., Koblizek M., Masojidek J. (2001) "Photosystem II-based biosensor for the detection of pollutants". *Biosensors & Bioelectronics* 16: 1027-1033

- Gilmartin, M., Revelante, N. (1991). Observations on particulate organic carbon and nitrogen concentrations in the Northern Adriatic Sea. *Thalassia Jugoslavica* 23: 39-49
- Graham L. E., Wilcox L. W. (2000) "Algae". Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey.
- Grzebyk D., Berland B. (1996) "Influences of temperature, salinity and irradiance on growth of *Prorocentrum minimum* (Dinophyceae) from the Mediterranean sea". *J Plankton Res.* 18: 1837-1849.
- Guasch H., Ivorra N., Lehmann V., Paulsson M., Real M., Sabater S. (1998) "Community composition and sensitivity of periphyton to atrazine in flowing waters : the role of environmental factors". *Journal of Applied Phycology* 10: 203-213
- Guasch H, Sabater S. (1998) "Light history influences the sensitivity to atrazine in periphytic algae." *J. Phycol.* 34: 233–241.
- Guillard, R.R.L., Ryther, J.H. (1962). "Studies of marine planktonic diatoms. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* Cleve". *Canadian Journal of Microbiology* 8: 229–239.
- Hamala JA, Kollig H.P. (1985). "The effects of atrazine on periphyton communities in controlled laboratory ecosystems." *Chemosphere* 14: 1391–1408.
- Hamilton P.B, Jackson G.S, Kaushik N.K, Solomon K.R, Stephenson G.L. (1988). "The impact of two applications of atrazine on the plankton communities of in situ enclosures." *Aquat Toxicol* 13: 123–140
- Heil C., Glibert P., Fan C. (2005) "*Prorocentrum minimum* (Pavillard) Schiller. A review of a harmful algal bloom species of growing worldwide importance" . *Harmful Algae* 4: 449-470

Heinz Streble e Dieter Krauter (1992). “*Atlante dei microrganismi acquatici*” Franco Muzzio Editore Pp 55-57

Hoagland K.D., Drenner R.W., Durward Smith J, Cross D.R. (1993). “Freshwater community responses to mixtures of agricultural pesticides: Effects of atrazine and bifenthrin.” *Environ Toxicol Chem* 12: 627– 637.

Hulburt, E. M. (1965) “Three closely allied dinoflagellates”. *J. Phycol.* 1: 95-96

Jüttner I, Peither A, Lay J.P, Kettrup A, Ormerod S.J (1995) “An outdoor mesocosm study to assess ecotoxicological effects of atrazine on a natural plankton community.” *Arch. envir. Contam. Toxicol.* 29: 435–441.

Kautsky, H., Hirsch, A. (1931). “Neue Versuche zur kohlenassimilation” *Naturwissenschaften* 19: 964.

LIFEHAB – Life histories of microalgal species. 2001 Garcès E., Zingone A., Montresor M., Reguera B., Dale B.,
<http://www.icm.csic.es/bio/projects/lifehab/LIFEHAB.pdf>

Lewin R.A. (2002) “Prochlorophyta, a matter of class distinctions “. *Photosynthesis Research*, 73: 59-61

Lewis, J. (1991). Cyst-theca relationships in *Scrippsiella* (Dinophyceae) and related orthoperidinoid genera. *Botanica Marina*. 34: 91-106.

Magnusson M., Heimann K., Negri A. P. (2008) “Comparative effects of herbicides on photosynthesis and growth of tropical estuarine microalgae”. *Marine Pollution Bulletin* 56: 1545- 1552

Margulis L., Corliss J. O., Melkonian M., Chapman D. J., (1990) “*Handbook of Protoctista*”, Jones and Bartlett Publisher, Boston.

Mayasich JM, Karlander EP, Terlizzi DE Jr (1986) "Growth responses of *Nannochloris oculata* Droop and *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin to the herbicide atrazine as influenced by light intensity and temperature". Aquat. Toxicol. 8: 175-184.

Mendez S. M., (1993). "Uruguayan red tide monitoring programme: preliminary results (1990-1991)". In Smayda T. J., Shimizu Y., (Eds.), Toxic Phytoplankton blooms in the Sea. Elsevier, Amsterdam, pp 287-291.

Paz B., Daranas A. H., Norte M., Riobò P., Franco J. M., Fernández J. J. (2008) "Yessotoxins a Group of Marine Polyether toxins: an Overview". Mar Drugs, 6(2): 73-102

Penna A., Ingarao C., Ercolessi M., Rocchi M., Penna N. (2006) "Potentially harmful microalgal distribution in an area of the NE Adriatic coastline: sampling procedure and correlations with environmental factors" Estuarine, Coastal and Shelf Science 70: 307-316.

Rochon A., Lewis J., Ellegaard M., Harding I.C. (2009) "The *Gonyaulax spinifera* (Dinophyceae) "complex": Perpetuating the paradox?". Review of Palaeobotany and Palynology 155: 52-60

Round F.E. (1981) "*The ecology of Algae*" Cambridge University Press

Sangiorgi F., Fabbri D., Comandini M, Gabbianelli G., Tagliavini E. (2005) "The distribution of sterols and organic-walled dinoflagellate cysts in surface sediments of the North-western Adriatic Sea (Italy)". Estuarine, Coastal and Shelf Science 64: 395-406

Sarake M., Mackenzie L., Yasumoto T. (1997). "Identification of *Protoceratium reticulatum* as the biogenic origin of yessotoxin." Nat. Toxins 5: 164-167.

Satake M., Mackenzie L., Yasumoto T., (1997). "Identification of *Protoceratium reticulatum* as the biogenic origin of yessotoxin." Nat. Toxins 5: 164-167.

Satake, M., Tubaro, A., Lee, J.S., Yasumoto, T., (1997). "Two new analogs of yessotoxin, homoyessotoxin and 45-hydroxyhomoyessotoxin, isolated from mussels of the Adriatic Sea". Natural Toxins 5: 107-110.

Smithsonian- National Museum of Natural History; Department of Botany;
References; Dinoflagellates;

<http://botany.si.edu/references/dinoflag/Taxa.htm>

Smyda, T.J. (1997) "What is a bloom? A commentary". Limnol. Oceanogr. 42: 1132-1136

Solomon K.R, Baker D.B, Richards R.P, Dixon K.R, Klaine S.J, La Point T.W, Kendall R.J, Weiskopf C.P, Giddings J.M, Giesy J.P, Hall L.W, Marty Williams W. (1996) Ecological risk assessment of atrazine in North American surface waters. Envir. Toxicol. Chem. 15: 31-76.

Sournia A., Belin C., Berland B., Erard-Le Denn E., Gentien P., Grzebyk D., Marcaillou-Le But C., Lassus P., Partensky F., (1991). "Le Phytoplancton Nuisible des cote de France de la Biologie à la Prevention". IFREMER, Centre de Brest, Plouzanè. 154 pp.

Species 2000 & ITIS Catalogue of Life: Annual Checklist 2010

Strickland J. D. e Parsons T. R. (1968) "A practical handbook of sea-water analysis". Bull. Fish. Res. Board Can, 167: 1-312

Tango P. J., Magnien R., Butler W., Lacouture R., Sellner K., Glibert P., Luckenbach M., Poukish C., Luckett C., (2005) "Characterization of impacts and potential effects due to *Prorocentrum minimum* blooms in Chesapeake Bay". Harmful Algae 4: 525-531

Taylor F. J. R., Fukuyo Y., Larsen J., Hallegraeff G. M. (2003) "Taxonomy of harmful dinoflagellates". In : Hallegraeff G. M., Anderson D. M., Cembella A. D. (Eds.), *Manual on Harmful Marine Microalgae*, UNESCO Publishing, Paris, pp. 389-482.

Tomas C. R (1997). "Identifying Marine Phytoplankton". Academic Press

Tubaro, A., Sidari, L., Della Loggia, R., Yasumoto, T., (1997)." Occurrence of yessotoxin-like toxins in phytoplankton and mussels from Northern Adriatic Sea". In: Reguera, B., Blanco, J., Fernandez, M.L., Wyatt, T. (Eds.), *Harmful Algae*. UNESCO, Santiago de Compostela, Spain, pp. 470-472.

Van den Hoek C., Mann D. G., Jahns H. M., (1995) " Algae – An introduction to phycology". Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom.

Vollenweider, R.A., Rinaldi, A., Montanari, G., (1992). "Eutrophication, structure and dynamics of a marine coastal system: results of ten-year monitoring along the Emilia Romagna coast (Northwest Adriatic Sea)". In: *Proceedings of an International Workshop on Marine Mucilage Phenomena*, Cesenatico, Forlì, Italy, 10 e 12 September, 1992 (Special Issue of *Marine Mucilages*). *Science of Total Environment* (Suppl.), 63-106.

Zavatarelli, M., Raicich, F., Bregant, D., Russo, A., Artegiani, A., (1998). "Climatological biogeochemical characteristics of the Adriatic Sea". *Journal of Marine Systems* 18: 227 e 263.

RINGRAZIAMENTI

Desidero innanzitutto ringraziare la Professoressa Pistocchi, per i preziosi insegnamenti durante i due anni di laurea magistrale, e per avermi permesso di conoscere il lavoro nel laboratorio di fitobiologia algale, nonché per le numerose ore dedicate al mio progetto di laurea. Un ringraziamento speciale va ad Emanuela che è riuscita nel suo moto perpetuo a insegnarmi tutti i segreti del laboratorio, e a sostenermi sempre nel momento del bisogno. Grazie a Franca, Silvana, Laura e Giulia che hanno contribuito a farmi apprezzare la vita da laboratorio fra un consiglio ed una risata. Un grazie a Lairetta con i suoi consigli dell'ultimo minuto. Un ringraziamento affettuoso a Flavio, un valido compagno di studio e di laboratorio sempre pronto a darmi una mano. Grazie ai miei compagni di corso della magistrale e della triennale con cui ho condiviso 5 anni faticosi ma pieni di bei ricordi. In particolare grazie a Elvira e Chiara per lo splendido periodo trascorso insieme e a Sole per le belle esperienze e... le figuracce fatte insieme!

Grazie infinite alla mia famiglia, ai miei genitori che mi hanno sempre sopportato e spronato a superare le difficoltà e a fare del mio meglio ... ne è valsa la pena! A mio fratello, che mi ha spinto a non accontentarmi e a guardare lontano, alla Mea per i lauti banchetti e ai miei cugini e alla zia Mau per la piacevole pausa domenicale dallo studio. Affettuosi ringraziamenti a mia "sorella" Kristina, che mi ha spronato a raggiungere nuovi obiettivi ma soprattutto mi ha permesso di apprendere l'indispensabile inglese!

Grazie mille a tutti i miei amici che mi hanno sostenuto in questo periodo di fatica di lamentele ma anche di grandi soddisfazioni, grazie mille a Filo, Vale, Fusco, Cesca, Chicca che sono sempre riusciti a farmi tornare il sorriso anche nei momenti più impegnativi, e un grazie a tutta la mia squadra con cui ho passato momenti di svago e di relax indimenticabili!